UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFISCHEN ERKENNUNG VON OBERFLÄCHENKOMPONENTEN IN ZELLMEMBRANEN DURCH RETINALE AXONE **IN VITRO**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Brigitte KERN-VEITS geb. Kern
aus Nürtingen

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0051

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFISCHEN ERKENNUNG VON OBERFLÄCHENKOMPONENTEN IN ZELLMEMBRANEN DURCH RETINALE AXONE *IN VITRO*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Brigitte KERN-VEITS geb. Kern

aus Nürtingen

1985

Tag der mündlichen Prüfung	7. Februar 1985
Dekan	Prof. Dr. H.U. Seitz
1. Berichterstatter	Prof. Dr. P. Hausen
2. Berichterstatter	Prof. Dr. D. Ammermann

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	9
	1. Material	9
	2. Methoden	13
	2.1. Oberflächenbehandlung der Glasträger	13
	2.2. Herstellung der RITC-gefärbten Retina-Explantate	13
	2.2.1. Präparation der Retina	13
	2.2.2. Färben der Retina mit RITC	14
	2.2.3. Hacken der Retina in Explantat-streifen	14
	2.3. Zellmembranpräparation aus Tectum- und Retinagewebe	15
	2.3.1. Unterteilung des Tectums	15
	2.3.2. Unterteilung der Retina	15
	2.3.3. Zellmembranpräparation	16
	2.3.4. Herstellung von Zellmembranschichten auf Deckgläsern	17
	2.4. Kultivierung von augenlosen Embryonen *in ovo*	17
	2.5. Chemische Behandlung von Zellmembranen	18
	2.5.1. Lectine	18
	2.5.2. Antikörper	18
	2.5.3. Galactosyltransferase	19
	2.5.4. Trypsin	19
	2.5.5. Fixierung	19
	2.6. Versuchsaufbau	19
	2.6.1. Wachstumsversuch	19
	2.6.2. Entscheidungsversuch	20

Seite

2.7. Mikroskopische Versuchsauswertung 22

2.7.1. Wachstumsversuche 22

2.7.2. Entscheidungsversuche 22

III. ERGEBNISSE 23

1. Allgemeines zum Wachstum von Axonen auf Zellmembranschichten 23

1.1. Zellmembranschichten 23

1.2. Allgemeines zum Axonwachstum 23

2. Verhalten von retinalen Axonen im Entscheidungstest 26

2.1. Versuchsauswertung 26

2.2. Bereits bekannte und zugrunde gelegte Fakten 26

2.3. Die bearbeiteten Fragestellungen 27

2.3.1. Erkennen retinale Axone Unterschiede von Membranvesikeln aus verschiedenen Tectumarealen? 28

2.3.2. Sind die von den temporalen Axonen erkannten Unterschiede zwischen anterioren und posterioren Tectummembranen positionsspezifisch oder spezifisch für das Entwicklungsstadium der Areale? 29

2.3.3. Zeigen Axone auf Membranvesikeln aus nicht innervierten Tectumarealen ein anderes Entscheidungsverhalten? 32

2.3.4. Ist der Unterschied zwischen anteriorem und posteriorem Tectum gestuft oder gradiert? 35

2.3.5. Kann das Verhalten der Axone im Entscheidungsversuch durch chemische Modifikation verändert werden? 37

3. Wachstumsverhalten von retinalen Axonen auf verschiedenen Substraten 49

3.1. Unterschiede im Wachstumsverhalten von nasalen und temporalen Axonen 49

Seite

3.2. Wachstum auf Membranschichten aus verschiedenen Tectum- und Retinaarealen 49

3.3. Retinales Axonwachstum auf chemisch modifizierten Membranen 51

3.3.1. Modifizierung durch Lectine 51

3.3.2. Modifizierung durch Fixierung 54

3.3.3. Modifizierung durch Antikörper 55

3.3.4. Modifizierung durch Proteasen 55

3.3.5. Modifizierung durch Glykotransferasen 55

IV. DISKUSSION 59

V. ZUSAMMENFASSUNG 76

VI. LITERATURVERZEICHNIS 77

I. EINLEITUNG

Wie finden Nervenfasern ihre Zielgebiete? Dies ist wohl eine der zentralsten Fragen, die das sehr komplexe Problem der Entstehung von geordneten Nervensystemen betreffen. In einem sich entwickelnden Tier müssen die axonalen Fortsätze der Nervenzellen Verknüpfungen mit anderen neuronalen Strukturen herstellen. Sie müssen nicht nur das Zielorgan, sondern innerhalb desselben die genaue Zielregion finden. Innerhalb der Zielregion werden bestimmte Zielzellen gesucht und auf diesen wiederum nur mit Zelloberflächenstrukturen bestimmter Zellregionen Synapsen gebildet. Ist das endgültige Ziel gefunden, wird das axonale Wachstum eingestellt.

Die Zielfindung erscheint noch komplexer angesichts der großen Zahl der zu verknüpfenden Neurone. Um das Ausmaß des Problems zu verdeutlichen, seien nur einige Zahlen genannt. Das Gehirn eines Säugetiers enthält etwa 10^5 Neurone pro Kubikmillimeter. Jedes Neuron wird durchschnittlich von 1000 anderen Neuronen innerviert, jeder Kubikmillimeter enthält im Durchschnitt einen Kilometer Neuriten und 10^9 Synapsen. Die Verknüpfung der Neuronen untereinander erfolgt mit sehr hoher Spezifität. Der Aufbau eines Systems so hoher Komplexität ist nur denkbar, wenn ihm präzise molekulare Mechanismen zugrunde liegen. Diese sind noch weitgehend unverstanden. Ein wichtiger Zweig der heutigen Neuroembryologie befaßt sich mit der Untersuchung dieser Mechanismen.

Als ein Modellsystem zur Untersuchung der spezifischen axonalen Zielfindung und Zielerkennung dient seit langem das visuelle System von Vögeln, Fischen und Amphibien. Das visuelle System dieser niederen Vertebraten ist experimentell

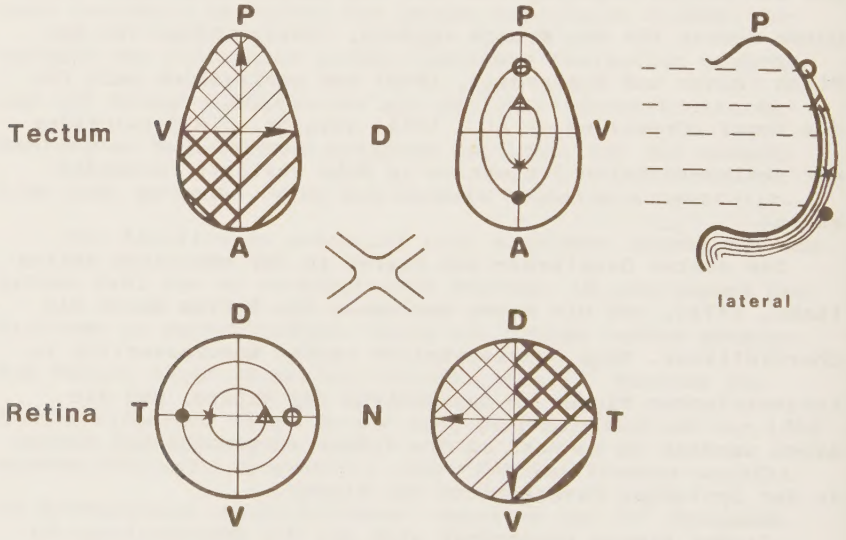
gut zugänglich. Es setzt sich zusammen aus den Retinae der beiden Augen und den Sehzentren in Mittel- und Zwischenhirn, von denen im Huhn das Tectum des Mittelhirns die wichtigste Verarbeitungsstelle für die visuellen Informationen darstellt und hoch differenziert ist. Von Cajal wurde bereits 1889 beschrieben, daß Retina und Tectum des Vogels durch retinale Axone verknüpft werden. Daß durch diese Verknüpfungen die Retina topographisch auf das Tectum abgebildet wird, wurde zuerst für den Frosch (Sperry, 1944), später für den Fisch (Buser und Dussardier, 1953) und schließlich auch für den Vogel (Crossland et al., 1974) gezeigt. Die Entwicklung der retino-tectalen Projektion im Huhn verläuft folgendermaßen:

Die ersten Ganglienzellen reifen in der zentralen Retina (Kahn, 1973), und die Axone verlassen die Retina durch die Choroidfissur. Neue Ganglienzellen reifen kontinuierlich in konzentrischen Ringen um das Zentrum der Retina, und die Axone wachsen in Kontakt zu den früher ausgewachsenen Axonen in der optischen Faserschicht zur Fissur.

Dieser Prozeß beschränkt sich auf die Embryonaltage E3 bis E13 (Rager, 1980). Am Tag E6 erreichen die ersten Axone das Tectum und wachsen an dessen anteriorem Pol auf das Tectum, terminieren aber in dessen Zentralregion (Rager, 1980). Spätere Axone aus periphereren Retinaregionen terminieren im peripheren Tectum (Abb.1).

Die Abbildung der Retina auf das Tectum ist spiegelbildlich: Dorsale (ventrale) Retina wird im ventralen (dorsalen) Tectum abgebildet, nasale (temporale) Retina projiziert in posteriores (anteriores) Tectum. Ventrale Axone

werden vor dem Tectum im optischen Nerv von dorsalen Axonen aussortiert (Thanos, 1983), und zwar so, daß sie schon vor der Ankunft am anterioren Tectumpol die richtige dorso-ventrale Position innehaben. Auf dem Tectum findet eine Zuordnung der Axone entsprechend ihrer Naso-Temporalität zu tectalen Zielzellen entlang der antero-posterioren Achse statt. Dabei wachsen die jüngsten nasalen Axone an der Oberfläche der Faserschicht



Retino-tectale Projektion

Abb. 1:
Die Abbildung zeigt einerseits die zeitliche Entwicklung der Projektion der Retina (links unten) auf das contralaterale Tectum (rechts oben), indem zunächst zentrale (1.Kreis *△) Axone auf zentrales Tectum, dann periphere (2.Kreis ● o) Axone auf peripheres Tectum projizieren. Die laterale Ansicht des Tectums macht die Faserverläufe und Zielpunkte (*△● o) der Axone deutlich.

Andererseits zeigt die Abbildung eine vereinfachte Darstellung der räumlichen Projektion der Retina (rechts unten) auf das contralaterale Tectum (links oben). Ventrale (dorsale) Retina projiziert auf dorsales (ventrales) Tectum, und temporale (nasale) Retina wird auf anteriores (posteriores) Tectum abgebildet.

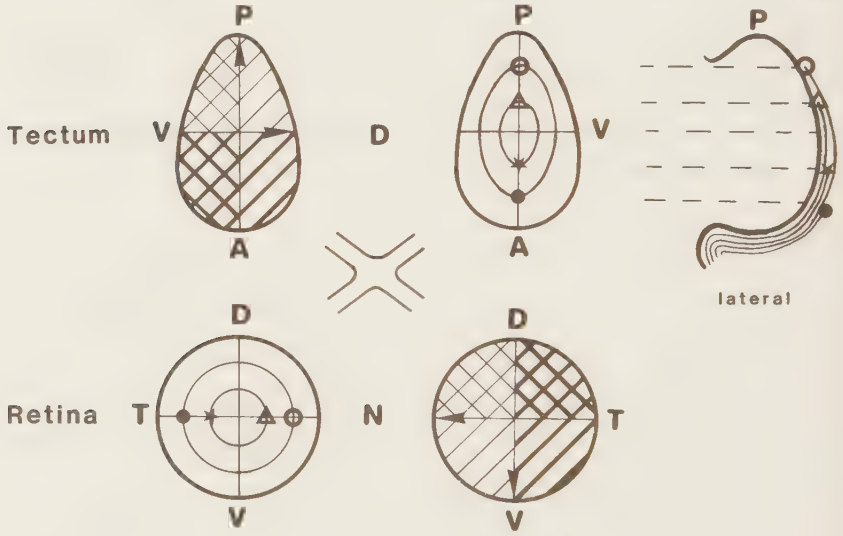
gut zugänglich. Es setzt sich zusammen aus den Retinae der beiden Augen und den Sehzentren in Mittel- und Zwischenhirn, von denen im Huhn das Tectum des Mittelhirns die wichtigste Verarbeitungsstelle für die visuellen Informationen darstellt und hoch differenziert ist. Von Cajal wurde bereits 1889 beschrieben, daß Retina und Tectum des Vogels durch retinale Axone verknüpft werden. Daß durch diese Verknüpfungen die Retina topographisch auf das Tectum abgebildet wird, wurde zuerst für den Frosch (Sperry, 1944), später für den Fisch (Buser und Dussardier, 1953) und schließlich auch für den Vogel (Crossland et al., 1974) gezeigt. Die Entwicklung der retino-tectalen Projektion im Huhn verläuft folgendermaßen:

Die ersten Ganglienzellen reifen in der zentralen Retina (Kahn, 1973), und die Axone verlassen die Retina durch die Choroidfissur. Neue Ganglienzellen reifen kontinuierlich in konzentrischen Ringen um das Zentrum der Retina, und die Axone wachsen in Kontakt zu den früher ausgewachsenen Axonen in der optischen Faserschicht zur Fissur.

Dieser Prozeß beschränkt sich auf die Embryonaltage E3 bis E13 (Rager, 1980). Am Tag E6 erreichen die ersten Axone das Tectum und wachsen an dessen anteriorem Pol auf das Tectum, terminieren aber in dessen Zentralregion (Rager, 1980). Spätere Axone aus periphereren Retinaregionen terminieren im peripheren Tectum (Abb.1).

Die Abbildung der Retina auf das Tectum ist spiegelbildlich: Dorsale (ventrale) Retina wird im ventralen (dorsalen) Tectum abgebildet, nasale (temporale) Retina projiziert in posteriores (anteriores) Tectum. Ventrale Axone

werden vor dem Tectum im optischen Nerv von dorsalen Axonen aussortiert (Thanos, 1983), und zwar so, daß sie schon vor der Ankunft am anterioren Tectumpol die richtige dorso-ventrale Position innehaben. Auf dem Tectum findet eine Zuordnung der Axone entsprechend ihrer Naso-Temporalität zu tectalen Zielzellen entlang der antero-posterioren Achse statt. Dabei wachsen die jüngsten nasalen Axone an der Oberfläche der Faserschicht



Retino-tectale Projektion

Abb. 1:
Die Abbildung zeigt einerseits die zeitliche Entwicklung der Projektion der Retina (links unten) auf das contralaterale Tectum (rechts oben), indem zunächst zentrale (1.Kreis *△) Axone auf zentrales Tectum, dann periphere (2.Kreis ● o) Axone auf peripheres Tectum projizieren. Die laterale Ansicht des Tectums macht die Faserverläufe und Zielpunkte (*△● o) der Axone deutlich.

Andererseits zeigt die Abbildung eine vereinfachte Darstellung der räumlichen Projektion der Retina (rechts unten) auf das contralaterale Tectum (links oben). Ventrale (dorsale) Retina projiziert auf dorsales (ventrales) Tectum, und temporale (nasale) Retina wird auf anteriores (posteriores) Tectum abgebildet.

bis ans Ende der Faserfront in Richtung des posterioren Pols, kontaktieren die nicht-innervierte Tectumoberfläche und terminieren in tieferen tectalen Laminae. Temporale Axone wachsen an der Oberfläche der Faserschicht, und vermutlich erkennen sie ihre Zielposition in der anterioren Tectumhälfte an Dendritenbäumen tectaler Zellen oder an Gliafortsätzen, die aus den axonalen Faserschichten herausragen.

Ähnlich entsteht die Abbildung der Retina auf das Tectum in Fischen und Amphibien (Straznicky und Gaze, 1971; Scholes, 1979), obwohl hier einige Besonderheiten auftreten. Während die Retina in konzentrischen Kreisen wächst, das Tectum jedoch nur an einem Pol, ist die Retinotopie stets vorhanden. (Straznicky und Gaze, 1971, 1972). Aus diesen Befunden schloß Gaze, daß während des kontinuierlichen Wachstums Axonterminale ständig ihre Verknüpfungen lösen und neue Verknüpfungen bilden müssen ("shifting connections", Gaze et al., 1974). Dieser logische Schluß wird durch experimentelle Beobachtungen (Stürmer, 1984) bestätigt.

Um die Bildung einer spezifischen topographischen Projektion zu erklären, wurden die verschiedensten Theorien aufgestellt. Auf Vorstellungen, nach denen Axone mechanisch durch Wachstum in Kanälen (Silver, 1984) oder ausschließlich durch Beibehaltung der retinalen Ordnung (Silver und Sidman, 1980) ihre Zielgebiete finden, wird hier nicht näher eingegangen, weil sie der Komplexität der axonalen Zielfindung nicht gerecht werden. Nach anderen Modellvorstellungen gelangen Axone entsprechend einem Raum-Zeit-Programm (Rager, 1980) oder durch Axon-Axon-Wechselwirkung (Willshaw und von

der Malsburg, 1976) in die richtigen tectalen Zielgebiete. Auch diese Vorstellungen werden nicht allen experimentellen Befunden gerecht. Die befriedigendste Erklärung für die Bildung der topographischen Projektion ist die Erkennung von positionsspezifischen Oberflächenmolekülen des Tectums durch das Axon. Diese Denkmöglichkeit geht zurück auf die von Sperry 1963 aufgestellte Chemoaffinitätstheorie. Jedes retinale Axon trägt entsprechend seiner Position in der Retina ein Oberflächenmolekül, mit dem es ein identisches oder komplementäres positionsspezifisches Molekül auf Zellen im tectalen Zielgebiet erkennt. Um mit einem solchen Erkennungsmechanismus nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip ein gutes Auflösungsvermögen zu erhalten, bedürfte es einer großen Anzahl verschiedener Oberflächenmoleküle, was mit der Begrenztheit des genetischen Materials nicht zu vereinbaren ist. Jedoch spricht die Beobachtung, daß retinale Axone direkt und nicht suchend auf ihre Terminationsgebiete zuwachsen, dafür, daß sie auf dem Tectum spezifisch ihre Zielrichtung erkennen. Man könnte sich vorstellen, daß molekulare Komponenten gradiert auf Retina und Tectum verteilt sind, so daß jede Zelle entsprechend ihrer Position in einem Gradientensystem der Retina eine ihr eigene Markierung trägt, mit der sie die tectale Zielzelle an Hand deren Markierung in deren Gradientensystem erkennt. Fraser (1980) und Gierer (1981) erstellten mathematische Beschreibungen zu diesem Gradientenmodell. Die Theorien zur axonalen Zielerkennung wurden verschiedenen experimentellen Tests unterzogen.

Untersuchungen zur Retinotopie durch operatives Entfernen von Teilen der Retina in sehr frühen Entwicklungsstadien resultieren in einer vorübergehenden Innervation des gesamten Tectums (McLoon, 1982), die keine Retinotopie zeigt. Letztlich sind jedoch nur noch die Tectumareale, die der verbleibenden Retina topographisch entsprechen, von Axonen innerviert (Crossland et a., 1974). Verbunden mit dem Prozeß der spezifischen Innervation werden vermutlich die Axone eliminiert, die Verknüpfungen in "falschen" tectalen Arealen gemacht haben. Aus diesem Versuch geht hervor, daß Axone letztlich spezifische Verknüpfungen mit tectalen Zielzellen eingehen und nicht willkürlich in beliebigen Arealen terminieren.

Wenn retinale Axone aus einem retinalen Transplantat in situ auf der tectalen Oberfläche auswachsen (DeLong und Coulombre, 1967; Goldberg, 1974; Thanos, 1983), zeigen sie die Fähigkeit, zumindest ihre Zielrichtung in der antero-posterioren Dimension zu erkennen.

Die Spezifität retinaler Zellen für ihre Zielareale auf dem Tectum wurde unter in vitro-Bedingungen untersucht, indem man ihre Adhäsivität testete. Dorsale (ventrale) Retinazellen oder deren Zellmembranen zeigen eine bevorzugte Bindung an ventrale (dorsale) Tectumhälften (Barbera et al., 1973; Gottlieb et al., 1974; Gottlieb et al., 1976; Gottlieb und Arington, 1979), was der retino-tectalen Verknüpfung in vivo entspricht. Man muß jedoch einschränkend bemerken, daß die Zielfindung eines Axons auf einer Wechselwirkung zwischen Wachstumskegel und Umgebung beruht. Die Oberfläche des Zellkörpers, die im Adhäsionsversuch getestet wurde, ist

dabei nicht beteiligt. Außerdem könnten die Eigenschaften der Oberflächen von Zellkörper und Wachstumskegel sehr verschieden sein (Bonhoeffer und Huf, 1980). Deshalb wurde ein in vitro-System entwickelt, in dem die Wechselwirkung des Wachstumskegels mit der Umgebung untersucht werden kann. In einem Entscheidungssystem, in dem retinale Axone die Wahl zwischen zwei Zellmonolayern verschiedener Herkunft haben (Bonhoeffer und Huf, 1982), konnte gezeigt werden, daß sich retinale Axone gemäß ihren Ursprungs in nasaler oder temporaler Retina voneinander unterscheiden und daß retinale Axone zwischen Zellen verschiedener tectaler Position unterscheiden können. Aus diesen Untersuchungen geht nicht hervor, welche Wechselwirkung Axon und Zielzelle miteinander eingehen. Durchaus denkbar war, daß der Stoffwechsel der Zielzelle wesentlich am Erkennungsmechanismus beteiligt ist.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Zellmembranen ein ausreichendes Substrat für wachsende Axone sind und ob der Erkennungsprozeß zwischen Axon und Zielzelle unabhängig vom Stoffwechsel der Zielzelle ist. In Anlehnung an das bestehende in vitro-System (Bonhoeffer und Huf, 1982) wurde ein neuartiges System entwickelt, in dem das Wachstums- und Entscheidungsverhalten von auswachsenden retinalen Axonen auf Zellmembranschichten untersucht wurde. Durch die experimentelle Einschränkung auf die Wechselbeziehung zwischen Wachstumskegel und Zellmembran ist es möglich, die wesentlichen Prozesse der spezifischen Zellerkennung zu untersuchen. Der Einsatz von Zellmembranen erlaubt die Untersuchung von neuronalen Geweben sehr verschiedenen Alters und bietet somit entscheidende Vorteile gegenüber der Ver-

wendung von Zellmonolayern, da die Isolierung von Einzelzellen nur in einer sehr begrenzten Entwicklungsphase gelingt. Unter Verwendung von Zellmembranen tectaler Areale aus verschiedenen Entwicklungsstadien des Huhns und verschiedener Position im Tectum wurde untersucht, ob axonale Zellerkennung bestimmter Areale positionsspezifisch ist oder vom Entwicklungsstadium abhängt und ob Membranen von normal innervierten Tecta sich von solchen aus nicht innervierten Tecta in ihren Substrateigenschaften unterscheiden. Ferner wurden Versuche mit chemisch modifizierten Membranvesikeln durchgeführt mit der Absicht, das axonale Wachstumsverhalten meßbar zu verändern und so Kenntnisse über die Natur der Oberflächenmoleküle zu erlangen. Mit Methoden der Biochemie und der Immunologie ist es mit diesem Versuchssystem vielleicht möglich, die molekularen Mechanismen der axonalen Zellerkennung besser verstehen zu lernen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Chemikalien, deren Bezugsquelle nicht gesondert aufgeführt wird, stammen von MERCK, Darmstadt.

Medien und Puffer:

Hanks Salzlösung (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

	g/Liter	
NaCl	8.0	
KCl	0.4	
KH_2PO_4	0.06	
$Na_2PO_4 \times 2H_2O$	0.06	
Glucose	1.0	
$NaHCO_3$	0.35	
Hepes	20mM	
Phenolrot	0.01	mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7.1)

	g/Liter
NaCl	8.0
KCl	0.2
KH_2PO_4	0.2
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	1.15
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.1
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0.1

Kulturmedium: Dulbeccos Modifikation von Eagle´s Medium, modifiziert nach Graf (CLAVIEZ, 1980)

+ 10% fötales Kälberserum (GIBCO, Glasgow, Scotland)

+ 2% Hühnerembryoextrakt (GIBCO, Glasgow, Scotland)

+ 10 Einheiten/ml Penicillin/Streptomycin

5 mM HEPES (N-2-hydroxy-piperazine-N´-2-ethan sulfonic aci

28 mM NaH_2CO_3

Homogenisierungspuffer

10 mM Tris/HCl pH 7.4

10 mM Spermidin (SERVA)

1.5 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$

Na-Phosphatpuffer (für PEG/Dextranmischung) 0.22 M, pH 6.8

	g/liter
$NaH_2PO_4 \times 1H_2O$	30.4
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	39.2
NaCl	0.13

PEG/Dextran - 2 Phasengemisch:

Dextran T 500 (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Schweden)

13.1 g in 67.8 g H_2O bidest bei 70°C lösen und auf Eis abkühlen lassen

Polyäthylenglykol (PEG, Carbowax 6000)

8.95 g in 67.8 g H_2O bidest bei 70°C lösen und auf Eis abkühlen lassen

+ 113.4g Na-Phosphatpuffer, im Scheidetrichter mischen und 2 Tage im Kühlraum auftrennen lassen.

Untere Phase (PEG) abfließen lassen und steril filtrieren, obere Phase (Dextran) abgießen und steril filtrieren.

Fixierlösung:

4 % p-Formaldehyd in PBS

0.33 M Sucrose (pH 7.4)

Feinchemikalien:

Lectine:	
Concanavalin (ConA)	SIGMA
Ricinus communis 60 (RCA 60)	SIGMA
Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)	BRL
Soybean Agglutinin, Type IV	SIGMA
Arachis hypogea (Peanut lectin)	PL biochemicals
Wheat germ Agglutinin	PL biochemicals
Solanum tuberosum	SIGMA
Trypsin (bovine pankreas)	Worthington
Neuraminidase	Behring
UDP-Galactose	SIGMA
Galactosyltransferase	SIGMA
Rhodamin-B-isothiocyanate (RITC)	SIGMA
Anti-N-CAM von Urs RUTISHAUSER, Cleveland, Ohio	

Kulturschalen

Petriperm-Schalen (Ø 5 cm)	HERAEUS

Membranenfilter

Membranfilter Typ SM N 13006 Porengröße 0.45 µm	SARTORIUS

Glasträger

Deckgläser Ø 2 cm, 100 µm dick	
Gläschen 11 mm x 3 mm, Längskante angeschliffen unter einem Winkel von 20° 200 um dick	HELLMA, Mühlheim, Bade
spitzer Winkel flach angeschliffen mit Schleifpulver Ceri 600	PIEPLOW & BRAN Henstett

Latexkugeln Ø 3 µm DUKE Scientific

Homogenisatoren, Zentrifugenröhrchen

5 ml Glashomogenisatoren		BRAUN Melsungen
L + S Pistill		BRAUN Melsungen
Glaszentrifugenröhren	30 ml + 15 ml	COREX, USA

Gewebehacker Mc Ilwain Tissue Chopper

Eier Hisex Bruteier

inkubiert in EHERT-Kleinmotorbrüter (Typ KMB V 2) bei 37°C und 65% Luftfeuchtigkeit und automatischer Drehung alle 6 Std.

Inkubatoren für Gewebekulturen: Forma Scientific (Typ 3156) Marietta Ohio. Inkubation bei 37°C, 4% CO_2

Zentrifugen:

Sorvall GLC 28 (DU PONT Instruments)

Sorvall

Mikroskope:

Präparations-Stereolupe	ZEISS
ZEISS-Axiomat, Umkehrfluoreszenzmikroskop	
Restlichtfernsehkamera	HAMAMATSU

Silikonkautschuk:

RTV-ME 625 A WACKER-Chemie, München

Silan (für Silanisieren von Glas):

Silan GF 31 WACKER-Chemie, München

Metallhalter: V4A-Stahl, Material Nr. 4571 (Eigenbau, MPI Werkstatt)

Filmmaterial: Ilford Pan F 18 DIN/50 ASA

2. Methoden

2.1. Oberflächenbehandlung der Glasträger

Die runden und die angeschliffenen rechteckigen Deckgläser werden zunächst in konz. Salpetersäure gekocht, dann mehrfach in bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.
Die trockenen und in Äthanol p.A. gespülten Deckgläser werden mit folgender Silan-Lösung behandelt:

5 ml Äthanol p.A.

und 150 µl Essigsäure p.A. (10%) werden gemischt, dazu gibt man 15 µl Silan GF 31 (Wacker-Chemie) und schüttelt kräftig.
Diese Silanmischung wird mit einem Wattestäbchen auf die Oberflächen bzw. die Kanten der Gläschen aufgerieben, und nach kurzer Trockenzeit werden die Oberflächen mit einem frischen Wattestäbchen kräftig poliert. Nach Spülen in Äthanol p.A. sind die Gläschen verwendbar und sollten nicht zu lange gelagert werden (nicht über 5 Std.), weil die Reaktivität der gebundenen Silankomponente mit der Zeit abnimmt. Die Silanmischung ist aus ähnlichen Gründen jedesmal frisch anzusetzen.

2.2. Herstellung der RITC-gefärbten Retina-Explantate

2.2.1. Präparation der Retina (Bonhoeffer und Huf, 1982)

Das Auge eines 6-Tage alten Embryos (Stadium 29, Hamburger und Hamilton, 1951) wird herauspräpariert und Sklera und Pigmentepithel in Hank´s Salzlösung entfernt. Linse und Glaskörper werden behutsam herausgelöst, und die Retina wird durch Öffnen der optische Fissur und durch drei zusätzliche kleine Einschnitte in

den Rand der Retina auf ein schwarzes vorbehandeltes Membranfilter (inkubiert in ConA 0.1mg/ml Hank´s für 1 Std., gefolgt von Waschen in Hank´s Salzlösung) ausgebreitet. Durch leichtes Andrücken mit einer Pinzette entlang des Randes der Retina und durch anschließendes kurzes Ansaugen auf einem Stück Filterpapier, haftet die Retina über ihre ganze Fläche am Membranfilter.

2.2.2. Färben der Retina mit RITC

Die Retina wird gefärbt, indem auf die nach oben zeigende Ganglienzellschicht für 5 min ein Stück RITC-gefärbten Agars gelegt wird. Der Agar wird folgendermaßen angesetzt: zu 1 ml warmen Agars (1% in Hank´s) gibt man unter Schütteln 20 ul RITC-Lösung (1 mg RITC in 20 µl DMSO) und füllt ihn zwischen zwei Objektträger mit einem Abstand von ca. 0.3 mm. Nach dem Erstarren wird die Agarschicht zweimal 20 min in Hank´s gewaschen und anschließend in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bis zum Gebrauch aufbewahrt.
Die gefärbte Retina wird dreimal mit warmem (37°C) Hank´s gewaschen und für 1 h in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert, um Überschußfarbe zu entfernen.

2.2.3. Hacken der Retina in Explantatstreifen

Die Retina wird mit ihrem unterliegenden Membranfilter kurz auf ein Stück Filterpapier gelegt und dadurch erneut an das Membranfilter angesaugt. Sie wird anschließend mit einem Mc Ilwain Tissuechopper in 0.275mm

breite Streifen gehackt. Die Retinastreifen werden im Versuch (siehe 2.6.) so auf das Substrat explantiert, daß die Ganglienzellen auf dem Substrat liegen.

2.3. Zellmembranpräparation aus Tectum- und Retinagewebe (nach der modifizierten (Halfter, 1981) Methode von Brunette und Till, 1971)

2.3.1. Unterteilung des Tectums

Tecta von 5, 6 und 7 Tage alten Embryonen wurden durch Trennung in der Mitte der Tecta in anteriore und posteriore Hälften geteilt.

In allen älteren Embryonen bis zu 3 Tage alten Küken bedeuten die Bezeichnungen anteriores bzw. posteriores Tectum das anteriore bzw. posteriore Drittel des Tectums. Das mittlere Drittel wird verworfen. Tecta von 9 Tage alten Embryonen werden gefünftelt mit Hilfe eines Schneidegerätes. Das Schneidegerät besteht aus 6 Drähten (Ø 50 µm), die in einen Metallring (Ø 20 mm) gespannt sind, einen gemeinsamen Befestigungspunkt haben und strahlenförmig unter gleichen Winkeln ($< 4^{\circ}$) auseinanderlaufen. Die Tectumfünftel wurden von anterior nach posterior als T1, T2, T3, T4 und T5 bezeichnet. Dorsale und ventrale Tectumteile werden erhalten durch Herausschneiden und Verwerfen der Mittelzone zwischen dorsalem und ventralem Tectum.

2.3.2. Unterteilung der Retina

Retinae von 9 Tage alten Embryonen wurden entweder ganz verwendet, oder in eine nasale und temporale Hälfte getrennt, unter Verwerfen der Mittelzone.

2.3.3. Zellmembranpräparation

Die Minimalgewebemenge für diese Präparation entspricht der Tectummenge von 2 9-Tage alten Tieren.
Die Maximalgewebemenge, die eingesetzt werden kann, ohne das System zu überlasten, entspricht der Tectummenge von ca. 15 9-Tage alten Tieren.
Das entsprechende Gewebe wird präpariert und in Hank´s gesammelt, die gesamte Prozedur wird bei 0°C durchgeführt. Das Gewebe wird mit Homogenisierungspuffer gespült, in 4 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und im Homogenisator 10 x mit dem L-Pistill und 30 x mit dem S-Pistill homogenisiert. Die Suspension wird im 30ml Corex-Glas 10 min bei 3000 UpM (= 1000g) und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in 5 ml PEG aufgenommen und nochmals 18 x mit dem L-Pistill homogenisiert.
Nach Zugabe von 5 ml Dextran und gutem Durchmischen der beiden Lösungen läßt man das Gemisch für ca. 10 min im 15ml Corexglas auf Eis stehen. Danach wird 10 min bei 12000 UpM (=23500g) und 4°C im Ausschwingrotor zentrifugiert. An der Grenzfläche zwischen Dextran und PEG reichern sich die Zellmembranen in Form einer Interbande an, das Sediment enthält vorwiegend Kerne, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum (Charakterisierung und Reinheitskriterien siehe Halfter, 1983). Die Interbande wird noch 2 x mit Hank´s gewaschen und auf eine Konzentration von 2.5-4mg/ml Protein verdünnt (Stammlösung).

2.3.4. Herstellung von Zellmembranschichten auf Deckgläsern

Die Membransuspensionen (1:20 verdünnt mit Hank´s) werden auf die silanisierten runden und angeschrägten rechteckigen Deckgläser (siehe 2.1.) während 7min mit 2000 UpM bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Um die benötigte Menge an Membranvesikeln gering zu halten, befinden sich die Deckgläser in sehr klein bemessenen, selbstgefertigten Behältern aus Silikonkautschuk. Die Behälter sind solchermaßen konstruiert, daß sie entweder ein rundes Deckglas oder mehrere angeschrägte Deckgläser (angeschrägte Kanten zeigen nach oben) aufnehmen können. Bei einer Füllmenge von 500ul Membransuspension entspricht die Suspensionshöhe über einem runden Deckglas 1.5-2mm bzw. 2mm über den angeschrägten Kanten der rechteckigen Deckgläser.

2.4. Kultivierung von augenlosen Embryonen in ovo

Hühnerembryonen werden bis Tag 3 im Inkubator vorinkubiert. Dann wird unter sterilen Bedingungen und Schrägdurchleuchtung zuerst in die Luftblase des Eies gestochen und, durch einen zweiten Stich durch die Eischale nahe dem durchscheinenden Embryo, die Luftblase an diese Stelle verlagert. Dadurch löst sich der Embryo mit seinem Blutkapillarsystem von der Eischale, sinkt in die Tiefe und ist so für weitere Manipulationen gut zugänglich.

Die beiden Einstichstellen werden mit Tesafilm zugeklebt, und die Eier bleiben bei 37^{o}C im Brutraum.

Ungefähr 24 h später, am Tag 4, wird den Embryonen operativ eine Augenanlage entfernt. Dazu erweitert man die 2. Einstichstelle zu einem runden Loch von ca. 15 mm Durchmesser. Die nach oben zeigende Augenanlage wird nach Öffnen der Chorionmembran entfernt. Nach Zukleben des Loches werden die operierten Tiere bis zum entsprechenden Entwicklungsstadium in ovo im Brutraum weiterkultiviert.

2.5. Chemische Behandlung von Zellmembranen

Die Zellmembranschichten (siehe 2.3.4.) werden auf den Deckgläsern mit den jeweiligen Reagentien behandelt.

2.5.1. Lectine

Die verwendeten Lectine wurden jeweils in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.
Die Membranschichten werden vorsichtig mit PBS gespült und mit 500 µl Lectinlösung für 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membranschicht dreimal mit PBS und einmal mit Kulturmedium gewaschen und kurz anzentrifugiert (3 min bei 2000 UpM und Zimmertemperatur).

2.5.2. Antikörper

Die Anti-N-CAM Stammlösung (Thiery et al., 1977) hat eine Fab-Konzentration von 4.5mg/ml und wird in Verdünnung 1:5 eingesetzt. Die Membranschichten werden 45 min bei Zimmertemperatur mit dem Antikörper inkubiert, anschließend gewaschen wie beschrieben unter 2.5.1.

2.5.3. Galactosyltransferase

Die Membranschichten werden 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert mit 500µl UDP-Galactose (2mM) und 20 µl (1/10 U) Galactosyltransferase. Die Waschschritte und Zentrifugationen entsprechen denen der in 2.5.1. beschriebenen Versuche.

2.5.4. Trypsin

Trypsin wird in einer Konzentration von 50 µg/ml (in PBS) und einer Inkubationszeit von 10 min bei Zimmertemperatur eingesetzt. Die Waschprozedur ist unter 2.5.1. beschrieben.

2.5.5. Fixierung

Membranschichten werden mit 500 µl p-Formaldehyd (4%, 0.33M Sucrose) 10 min bzw. 20 min bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend mehrfach mit PBS gewaschen und über Nacht in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert, um das Fixans vollständig zu entfernen.

2.6. Versuchsaufbau

Alle Versuche werden in ca. 3 ml Kulturmedium in Petriperm-Schalen durchgeführt. Zur Konditionierung des Mediums wird ein 6 Tage altes Tectum hinzugefügt.

2.6.1. Wachstumsversuch

Ein RITC-gefärbtes Retina-Explantat (2.2) wird so auf die Zellmembranschicht eines runden Deckgläschens aufgelegt, daß die Ganglienzellschicht der Retina die

Membranschicht berührt. Die Enden der Explantatstreifen werden beschwert mit V4A Stahlklötzchen.
Um gleiche Versuchsbedingungen zu haben, wird der Kontrollversuch in der gleichen Schale mit dem eigentlichen Versuch inkubiert.

2.6.2. Entscheidungsversuch

Schematische Darstellung siehe Abb. 2. Das Deckglas ruht auf einem Kugellager aus Latex-Kugeln (Ø3µm), das kleine Stöße mildern soll. Ausgehend vom Versuchsaufbau für Wachstumstests (2.6.1.) wird den Axonen, nachdem sie ungefähr 200 µm entlang der einen Membranschicht gewachsen sind, eine Entscheidung angeboten. Die Entscheidung besteht darin, entweder auf der einen Membranschicht weiter, oder aber entlang einer zweiten Membranschicht (auf dem angeschrägten Deckgläschen) nach oben zu wachsen.
Getestet wird das bevorzugte Wachstum von Axonen auf bestimmten Substraten (Membranschichten). Ungefähr 16 Stunden nach dem Explantieren werden die angeschrägten Deckgläser mit der zweiten Membranschicht parallel zu den Explantatstreifen, in einem Abstand von ca. 200µm, in eine Halterung aus V4A-Stahl eingeführt. Die Deckgläschen ruhen auf Latexkugeln (Ø 3 µm), die nach dem Explantieren auf die Membranschichten aufgebracht wurden. Somit können sich die beiden Membranschichten nicht berühren.
Zum Zeitpunkt des Anbietens der zweiten Membranschicht beginnen die Axone erst auszuwachsen und haben eine Länge von weniger als 200 µm.

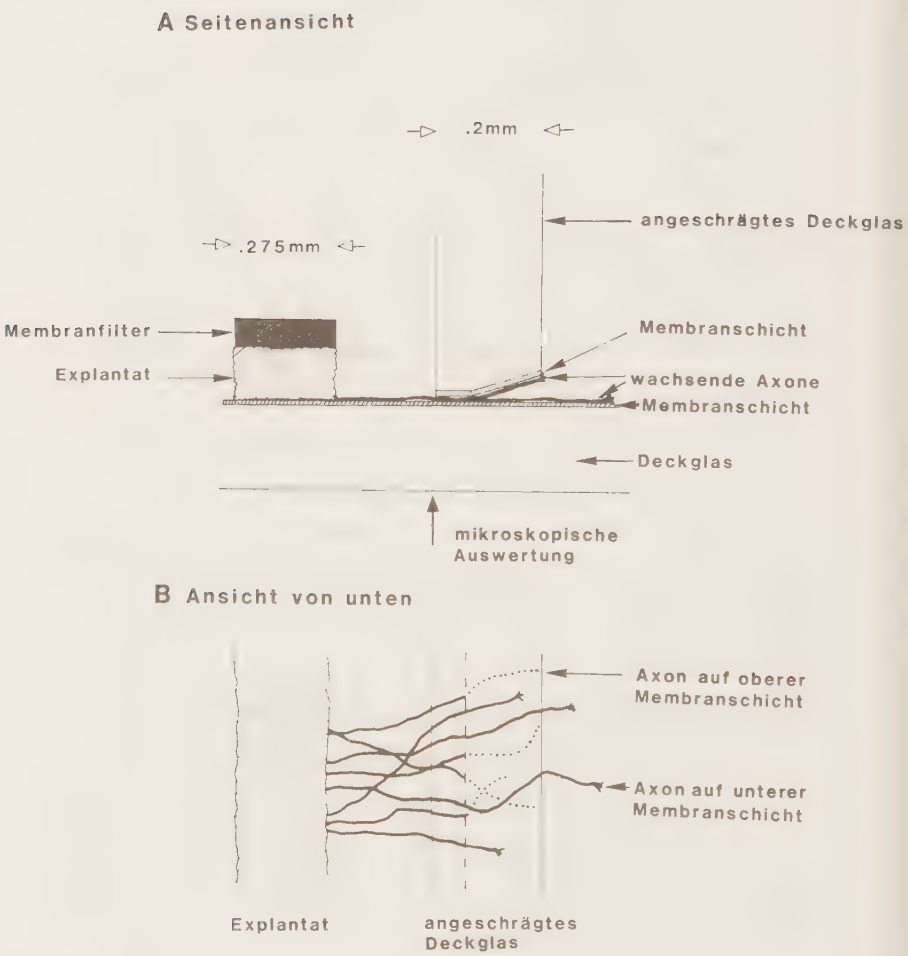


Abb. 2: Versuchsaufbau für Entscheidungstests.
In der Seitenansicht A wachsen Axone aus einem Explantat entlang einer Membranschicht und entscheiden sich z.T. für eine zweite Membranschicht (auf angeschrägtem Deckglas). Die Ansicht B gibt die Situation der mikroskopischen Auswertung wieder. Auswachsende Axone auf der unteren Membranschicht werden über ihre gesamte Länge beobachtet. Axone, die entlang der oberen Membranschicht wachsen (gepunktete Linien) werden durch Nachfokussieren beobachtet.

2.7. Mikroskopische Versuchsauswertung

2.7.1. Wachstumsversuche

Die nach 40 bis 45 Std. Inkubation im Brutschrank gewachsenen Axone werden mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop durch den Schalenboden hindurch betrachtet, ihre Faserlänge bestimmt, ihr Bündelungsverhalten untersucht und die Faserdichte abgeschätzt.

2.7.2. Entscheidungsversuche

Die Auswertung der Entscheidungsversuche erfolgt mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskopes (Axiomat) bei einer Wellenlänge des anregenden Lichtes von 545nm. Das emitierte Licht (> 590 nm) wird, verstärkt durch eine Restlichtkamera, auf einen Fernsehmonitor übertragen.

Einzelne Explantatstreifen werden Bildausschnitt für Bildausschnitt von nasal nach temporal abgerastert. Dabei werden die fluoreszierenden Axone auf der unteren Membranschicht, und die, welche entlang der schräg ansteigenden Membranschicht wachsen, ausgezählt.

III. ERGEBNISSE

1. Allgemeines zum Wachstum von Axonen auf Zellmembranschichten

1.1. Zellmembranschichten

Die Membranvesikel bedecken die Glasoberflächen in einer gleichmäßigen, kontinuierlichen dünnen Schicht von maximal einigen Mikrometer Dicke. Die Membranvesikel haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 1µm; der Durchmesser variiert von etwa 4µm bis hinunter zu 0.1µm (Halfter, 1983). Da die Vesikel bei längerem Stehen in Lösung bei Zimmertemperatur die Tendenz zur Aggregatbildung zeigten, wurden die Membransuspensionen stets frisch präpariert, zügig verarbeitet und auf die Glasoberflächen zentrifugiert.

Die Menge von Membranvesikeln pro Glasplättchen (Ø 2cm) entspricht der Menge von 1/4-1/5 des Tectums eines 9 Tage alten Embryos, was etwa 2×10^7 Zellen entspricht. Aus diesen Zahlen errechnet sich eine Membranschichtdicke von durchschnittlich 7 Vesikelschichten. Der Proteingehalt beträgt 60-100µg pro Glasplättchen.

1.2. Allgemeines zum Axonwachstum

Für Retinaexplantate werden Retinae von 6 Tage alten Embryonen verwendet, weil zu diesem Zeitpunkt das Faserwachstum aus den Explantaten ein Optimum erreicht (Halfter, 1981).

Die retinalen Axone beginnen nach einer Latenzzeit von 10-12 Stunden aus dem Explantat auf die Membranschicht auszuwachsen und behalten dabei eine durch die Struktur des Retinaexplantates vorgegebene Orientierung bei (Halfter, 1983). Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit beträgt 50µm/Std und ergibt bei fortschreitendem Wachstum mit Berücksichtigung der Latenzzeit eine Faserlänge von 1.5mm nach 40 Stunden Inkubation.

Die Wachstumsgeschwindigkeiten der Axone können von diesen Durchschnittswerten abweichen. Sie hängen vom Ursprung der Membranvesikel ab, auf denen die Axone entlangwachsen. Auf diesen Punkt wird ausführlich in dem nachfolgenden Kapitel 3 eingegangen.

Axone der temporalen Retina unterscheiden sich von nasalen Axonen darin, daß sie häufig gebündelt auswachsen. Die Struktur der Bündelung ist von dem unterliegenden Substrat abhängig (Abb.3). Dieses Bündelungsverhalten der temporalen Axone wurde von Bonhoeffer und Huf (1982) auf Zellmonolayern und von Halfter (1983) auf Collagenschichten beobachtet.

Es konnte kein Axonwachstum innerhalb der Löcher schadhafter Membranschichten beobachtet werden. Demnach ist eine silanisierte Glasoberfläche als Substrat nicht ausreichend für das Wachstum retinaler Axone.

Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation der Explantatkulturen beginnen die Axone langsam zu degenerieren und schließlich zu zerfallen.

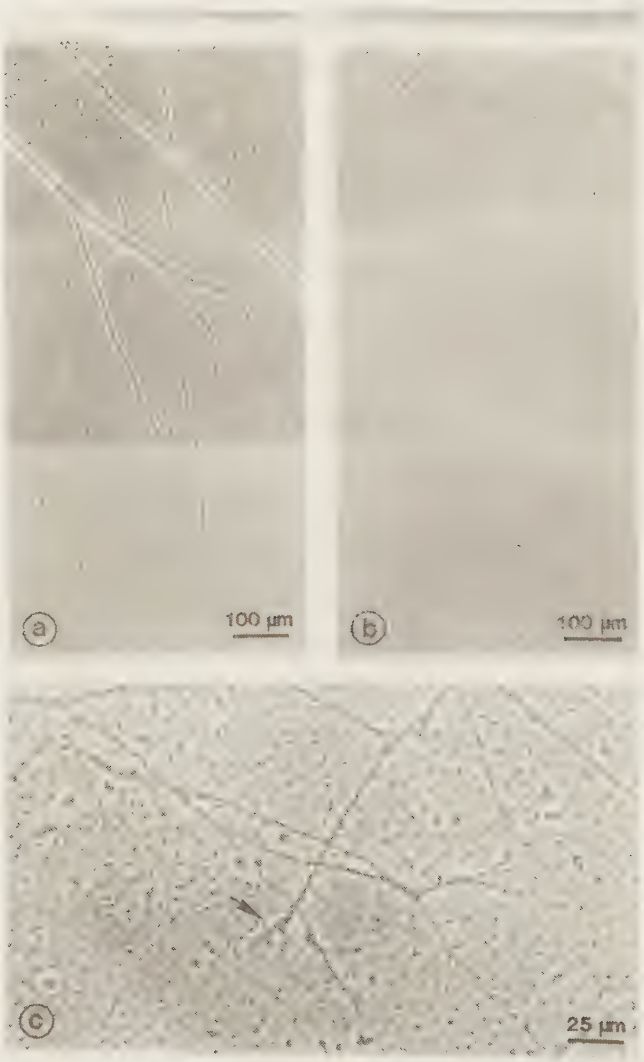


Abb.3 Axonales Faserwachstum auf Zellmembranschichten.
a) Axone der temporalen Retina und
b) der nasalen Retina nach ca. 40 Stunden Wachstum.
c) Einzelaxone und dünne Faszikel mit Wachstumskegel (Pfeil) in stärkerer Vergrößerung.

2. Verhalten von retinalen Axonen im Entscheidungstest

2.1. Versuchsauswertung

Im Entscheidungsversuch werden jeweils alle fluoreszierenden Axone des Explantatstreifens gezählt, die die Entscheidungsstelle passiert hatten. Nasale und temporale Axone werden getrennt aufgelistet; Axone, die sich für die obere Membranschicht entscheiden, werden zu den auf der unteren Membranschicht weiterwachsenden Axonen ins Verhältnis gesetzt (siehe Tabellen 1-5). Die Mittellinie zwischen nasalem und temporalem Explantat wird zunächst ungefähr durch Ausmessen festgelegt und bestätigt sich durch den drastischen Unterschied im Verhalten von nasalen und temporalen Axonen.

2.2. Bereits bekannte und zugrundegelegte Fakten

In früheren Entscheidungsversuchen mit Zellmonolayern (Bonhoeffer und Huf, 1982) konnte folgendes gezeigt werden:

- Retinale Axone können retinale von tectalen Zellen unterscheiden.
- Temporale retinale Axone können zwischen Zellen aus verschiedenen Positionen des Tectums unterscheiden.
- Temporale und nasale Axone der Retina unterscheiden sich in ihren Erkennungsfähigkeiten.
- Zellmembranen sind ein ausreichend gutes Substrat für axonales Wachstum (Kern-Veits, 1981; Kern-Veits und Bonhoeffer, 1982).

2.3. Die bearbeiteten Fragestellungen

Frage: Erkennen retinale Axone Unterschiede von Membranvesikeln aus verschiedenen Tectumarealen?

Wie im Folgenden noch ausführlich dargelegt wird, unterschieden sich temporale Retinaaxone von nasalen Axonen in ihrer Eigenschaft, anteriore tectale Membranvesikel von posterioren unterscheiden zu können und anteriore eindeutig als Substrat zu bevorzugen. Dieser Befund führt zu der Frage, ob temporale Axone Membranen von anteriorem Tectum deswegen bevorzugen, weil diese positionsspezifische Moleküle tragen, oder weil sie aus demjenigen Tectumareal stammen, das den am weitesten fortgeschrittenen Reifungszustand erlangt hat.

Frage: Sind die von den temporalen Axonen erkannten Unterschiede zwischen anterioren und posterioren Tectummembranen positionsspezifisch oder spezifisch für das Entwicklungsstadium der Areale?

Infolge der fortschreitenden Innervierung des Tectums durch retinale Axone *in vivo* enthalten tectale Membranpräparationen aus älteren Embryonen einen stärkeren Anteil an Axonmaterial, insbesondere Membranpräparationen aus anteriorem Tectum. Es erwächst die Frage, ob temporale Axone *in vitro* anteriore Membranvesikel bevorzugen, weil diese einen hohen Anteil an Axonmaterial enthalten oder weil sie bestimmte attraktive Positionsmarkierungen tragen, die sich

vorwiegend auf anterioren Tectummembranen befinden.

Frage: Zeigen Axone auf Membranvesikeln aus nicht-innerviertem Tectum ebenfalls eine Bevorzugung von anterioren Membranvesikeln?

Da anteriores und posteriores Tectum eindeutig verschiedene Membraneigenschaften besitzen, stellt sich die Frage nach den Verteilungen von Positionsmarkierungen auf dem Tectum.

Frage: Handelt es sich bei dem Unterschied zwischen anteriorem und posteriorem Tectum um ein gestuft oder gradiert verteiltes Merkmal?

Schließlich wurde untersucht, ob positionsspezifische Moleküle auf dem Tectum so verändert werden können, daß sie nicht mehr in der erwarteten Weise von retinalen Axonen erkannt werden.

Frage: Kann das Verhalten der Axone im Entscheidungsversuch durch chemische Modifikation der Membranvesikel verändert werden?

2.3.1. Erkennen retinale Axone Unterschiede von Membranvesikeln aus verschiedenen Tectumarealen?

Gibt man auswachsenden Axonen die Möglichkeit, sich zwischen Membranschichten aus verschiedenen Arealen eines 9 Tage alten Tectums zu entscheiden, so werden folgende Ergebnisse erhalten:

Bei der Wahl zwischen Membranen des anterioren und posterioren Tectums bevorzugen temporale Axone eindeutig anteriore Membranen. Befinden sich anteriore Membranen auf der oberen Glaskante, wachsen 72% der temporalen Axone nach oben; sind posteriore Membranen oben, wachsen die Axone zu 99% auf den anterioren Membranen (Tabelle 1, Stadium E9) weiter.

Nasale Axone unterscheiden sich streng von temporalen Axonen, indem sie keine Präferenz für anteriore oder posteriore Membranen zeigen.

Ein Kontrollversuch, in dem den Axonen auf beiden Glasträgern identische Membranen angeboten werden, ist in Tabelle 3, Zeile 1, aufgeführt. Obere und untere Membranschichten stammen aus 9 Tage altem anteriorem Tectum. Nasale und temporale Axone unterscheiden sich nicht voneinander und wachsen zu 49% bzw. 45 % entlang der oberen Membranschicht.

Unterschiede in der Präferenz von nasalen und temporalen Axonen aus der ventralen bzw. dorsalen Retinahälfte für dorsale bzw. ventrale Tectummembranen waren nicht signifikant.

Eindeutig konnte also gezeigt werden, daß temporale Axone Membranvesikel aus anteriorem Tectum erkennen und solchen aus posteriorem Tectum als Substrat vorziehen.

2.3.2. Sind die von den temporalen Axonen erkannten Unterschiede zwischen anterioren und posterioren Tectummembranen positionsspezifisch oder spezifisch für das Entwicklungsstadium der Areale?

Das optische Tectum entwickelt sich ausgehend vom ante-

rioren Pol entlang seiner antero-posterioren Achse (LaVail und Cowan, 1971). Das bedeutet, daß der anteriore Pol einen Entwicklungsvorsprung gegenüber dem posterioren Pol hat. A priori wäre durchaus denkbar, daß temporale Axone anteriore von posterioren tectalen Membranen auf Grund eines entwicklungsbedingten Unterschiedes zwischen anteriorem und posteriorem Tectum unterscheiden.

Dieser Vorstellung widersprechen Versuche, die in Tabelle 1 zusammengefaßt sind. Aus ihnen geht hervor, daß anteriore Tectummembranen von Stadium E7, E9, E11 und P3 eindeutig von temporalen Axonen als Substrat posterioren Membranen vorgezogen werden. Werden anteriore Membranen oben angeboten, wachsen über 70% der temporalen Axone nach oben oder es bleiben über 80% der Axone auf der unteren Membranschicht, wenn diese aus anteriorem Tectum besteht. Die erkannten Unterschiede sind also positionsbedingt und nicht entwicklungsbedingt.

Nasale Axone zeigen auf Tectummembranen von Entwicklungsstadium E7, E9, E11 und P3 keine Präferenz für anteriores oder posteriores Tectum und haben auf Membranvesikeln der aufgeführten Entwicklungsstadien eine Faserverteilung von annähernd 50% der Axone auf dem oberen und 50% auf dem unteren Substrat.

Abweichend hiervon verhalten sich nasale Axone auf Membranen von sehr jungen Tecta (Entwicklungsstadium E5 und E6). Die Tecta diesen Alters sind sehr zarte Gebilde, insbesondere der posteriore Teil. Auf Membranen von E6-Tecta vermögen Axone nur langsam auszuwachsen. Temporale wie na-

sale Axone entscheiden sich für anteriores Tectum (Tabelle 1). Wesentlich schlechtere Substrateigenschaften weisen Membranen von 5 Tage alten Tecta auf (Tabelle 1). Verhältnismäßig wenigen Fasern gelingt es nach ca. 5-tägigem Wachstum, die Entscheidungsstelle zu passieren. Waren die Axone auf posterioren Membranen gewachsen, so entscheidet sich der Großteil der Axone für das obere Substrat, die anterioren Membranen. Im umgekehrten Experiment wachsen alle Fasern ausschließlich auf den anterioren Membranen weiter.

Die Entscheidung der Axone für junges anteriores Tectum könnte interpretiert werden als ein Verhalten auf einen Entwicklungsvorsprung des anterioren gegenüber dem posterioren Tectum, das noch nicht genügend differenziert ist, um Axonen als Substrat zu dienen.

Um die Präferenz nasaler Axone für junges anteriores Tectum zu erklären, kann ein Experiment hinzugezogen werden, in dem anteriore Membranen von Stadium E6 mit solchen von Stadium E9 verglichen werden (Tabelle 3). Diese Membranen stammen aus tectalen Arealen der gleichen Position aber verschiedenen Differenzierungsgrades. Nasale Axone zeigen eine deutliche Bevorzugung für Membranen von den jüngeren anterioren Tecta. Das spricht dafür, daß junges anteriores Tectum eine für nasale Axone wesentliche Komponente enthält, die in späteren Entwicklungsstadien nicht so stark ausgeprägt ist.

In einem weiteren Experiment (Tabelle 3) wurde nasalen Axonen die Entscheidung zwischen anterioren Membranen von Stadium E5 und posterioren Membranen von Stadium E10, d.h.

Arealen mit unterschiedlichen Positionsmarkierungen, aber etwa entsprechendem Differenzierungsgrad, ermöglicht. Auch hier entscheiden sich nasale Axone für das junge anteriore Tectum, was nahelegt, daß nicht allein der Differenzierungsgrad, sondern auch die Position entscheidend ist. Es bleibt unklar, ob nasale Axone eine attraktive 'entwicklungsspezifische Membrankomponente des jungen anterioren Tectums bevorzugen, oder ob sie die positionsspezifische Komponente erkennen, die gemäß dem Gradientenmodell (Review Bonhoeffer und Gierer, 1984) von anterior nach posterior gradiert auf dem Tectum verteilt ist. Um die Präferenz nasaler Axone für Membranen aus jungem anteriorem Tectum zufriedenstellend zu erklären, bedürfte es weiterer Versuche.

Temporale Axone bevorzugen stets Membranen aus anteriorem Tectum gegenüber posterioren Membranen. Aus den vorangestellten Ergebnissen geht hervor, daß diese Präferenz auf positionsspezifischen Oberflächenmolekülen des anterioren Tectums beruht. Im Vergleich anteriorer Membranen von E6 und E9 zeigen temporale Axone eine schwache Bevorzugung der jüngeren anterioren Membranen. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß sie auch entwicklungsabhängige Unterschiede in Membrankomponenten erkennen.

2.3.3. Zeigen Axone auf Membranvesikeln aus nicht-innervierten Tectumarealen ein anderes Entscheidungsverhalten?

Untersuchungen zum Wachstum retinaler Axone auf dem Tectum (Goldberg, 1974) ergaben, daß die ersten retinalen

Axone am Embryonaltag E5 auf das Tectum einwachsen. Zum Tag E9 hat die Faserfront die Hälfte der Tectumoberfläche passiert und am Tag E12 schließlich ist die gesamte Tectumoberfläche von Axonen bedeckt. Somit sind Membranpräparationen aus anteriorem Tectum ab Entwicklungsstadium E6 stets in geringerem oder stärkerem Ausmaß mit Membranmaterial von Axonen der nasalen und temporalen Retina kontaminiert. Membranpräparationen des posterioren Tectums weisen ab Entwicklungsstadium E9 einen stärker werdenden Anteil an Axonmaterial, jedoch hauptsächlich von Axonen der nasalen Retina auf. Wäre die Attraktivität von anterioren Membranpräparationen für temporale Retinaaxone bedingt durch den Axonanteil in der Membranpräparation, so müßten temporale Axone auf Membranen nicht-innervierter Tecta ein geändertes Entscheidungsverhalten zeigen.

In Versuchen, in denen sich Axone zwischen Membranvesikeln aus anteriorem und posteriorem nicht-innerviertem Tectum entscheiden konnten, ergaben sich keine grundlegenden Unterschiede zu Versuchen mit normal innervierten Tecta (Tabellen 2 und 3). Anteriore Membranvesikel von 11, 12 und 14 Tage alten nicht-innervierten Tecta (Tab.2) wurden gegenüber posterioren Membranen als unterer Schicht zu über 70% von temporalen Fasern bevorzugt. Im umgekehrten Experiment wuchsen über 90% der temporalen Axone präferentiell entlang der unteren, anterioren Membranschicht.

Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten mit normal innervierten Tecta (Tab.1) vergleichbarer Entwicklungsstufen. Nasale Axone scheinen keine Unterscheidung zwischen

anterioren und posterioren Membranen zu machen und wachsen im gleichen Verhältnis auf oberer und unterer Membranschicht. Unverstanden ist, warum nasale Axone in mehreren Versuchen mit 14 Tage alten nicht-innervierten Tecta eine schwache Präferenz für die jeweilige obere Membranschicht zeigen.

Nasale sowie temporale Axone zeigen keine Präferenz für anteriore Membranen aus normal-innervierten oder nicht-innervierten 9 Tage alten Tecta (Tab.3). Sie wachsen zu gleichen Anteilen auf Membranschichten aus innervierten und nicht-innervierten Tecta und verhalten sich wie im Kontrollversuch, bestehend aus zwei anterioren Membranschichten normal innervierter Tecta (Tabelle 3).

Posteriore Membranen von nicht-innervierten 10 Tage alten Tecta sind im Vergleich zu anterioren Membranen von 5 Tage alten Tecta (Tabelle 3) ein ebenso schlechtes Substrat wie posteriore Membranen von 10 Tage alten normalen Tecta (siehe auch 2.3.2). Nasale und temporale Axone bevorzugen eindeutig zu 74% bzw. 83% die obere Membranschicht aus 5 Tage altem anteriorem Tectum; werden anteriore Membranvesikel als untere Schicht angeboten, wachsen 88% der nasalen und 96% der temporalen Axone auf der unteren Membranschicht weiter.

Retinale Axone zeigen auf Membranvesikeln aus nicht-innervierten Tectumarealen kein anderes Entscheidungsverhalten als in Experimenten mit normal innervierten Tecta. Das heißt, daß Membranpräparationen mit und ohne Axonmaterial ein gleich gutes oder gleich schlechtes Substrat,

entsprechend den Tectumarealen, für das Wachstum von retinalen Axonen sind. Zum zweiten bedeutet dies, daß Axone nicht notwendigerweise, soweit das in diesem Testsystem nachweisbar ist, retinales Axonmaterial in den Membranpräparationen als Substrat benutzen. Axone scheinen sich primär an Zellmembran-Komponenten zu orientieren, die auch auf einem jungfräulichen Tectum vorhanden sind.

2.3.4. Ist der Unterschied zwischen anteriorem und posteriorem Tectum gestuft oder gradiert?

Davon ausgehend, daß retinale Axone in ihrer Entscheidungsfähigkeit nicht durch das in den Membranpräparationen enthaltene retinale Axonmaterial beeinflußt werden (siehe 2.3.3), wurden für diese Untersuchungen normal innervierte 9 Tage alte Tecta verwendet. Die Tecta von 5 bis 6 Tieren wurden in 5 Teile geteilt und die Teile, beginnend mit dem anterioren, als T1, T2, T3, T4 und T5 bezeichnet.

Würde man zwischen anteriorem und posteriorem Tectum einen stufenförmigen Unterschied erwarten, hätten T1 und T2 sowie T4 und T5 jeweils ähnliche Eigenschaften. Demnach dürfte es in Entscheidungsversuchen zwischen T1 und T2 bzw. T4 und T5 zu keiner starken Bevorzugung einer Membranschicht durch temporale Axone kommen, sondern annähernd zu einer Gleichverteilung der Axone auf oberer und unterer Membran-[illegible].

Ist die Membrankomponente, die die Attraktivität des anterioren Tectums für temporale Axone bedingt, gradiert über das Tectum verteilt, so müßte das relativ anteriore

Teilstück für temporale Axone attraktiver sein als das relativ posteriore Teilstück.

In den Experimenten (Tab.4) T1/T3, T2/3, T3/4 und T4/T5, in denen Membranvesikel des relativ anterioren Tectums als obere Schicht angeboten werden, wachsen im Durchschnitt 72% der temporalen Axone nach oben. In den Umkehrexperimenten, in denen die relativ anterioren Membranvesikel die untere Schicht bilden, bleiben (ausgenommen Versuch T5/T4) über 80% der temporalen Axone unten.

In Versuch T5/T4 wachsen die temporalen Axone nicht präferenziell entlang einer bestimmten Schicht, sondern wachsen zu annähernd 50% auf der oberen bzw. der unteren Schicht.

In den ersten drei Versuchen bevorzugen temporale Axone die jeweils relativ anterioren Membranschichten. Diese Ergebnisse sprechen für eine gradiert verteilte Komponente, die von anterior nach posterior abnimmt und die von temporalen Axonen erkannt und in den Tectumteilen quantitativ unterschieden wird.

Nasale Axone zeigen in 15 Versuchen eine Präferenz für relativ posteriore Tectumteile als obere Membranschichten. Diese Ergebnisse sind nicht als Bevorzugung posteriorer Membranen durch nasale Axone zu interpretieren, weil sie nicht durch die Umkehrexperimente bestätigt werden können. In den Umkehrexperimenten kommt es in mehreren Fällen zu einer Bevorzugung anteriorer Membranen als oberen Schicht. Als Erklärungsmöglichkeit könnte angeführt werden, daß die oberen Membranschichten mehrere Stunden später in den Ver-

suchsansatz eingebracht werden. Es konnte aber gezeigt werden, daß Membranen in den oberen Schichten sich von unteren Membranschichten in ihren Eigenschaften, auswachsenden Axonen als Substrat zu dienen (siehe z.B. Tab.3, Versuch A/A), nicht unterscheiden.

Es sollte an dieser Stelle betont werden, daß in diesen Versuchen die Membranpräparation nicht aus einem Teilstück eines Tectums, sondern aus bis zu 20 Tecta gewonnen wurde. Das bedeutet, daß die entsprechenden Teilstücke nie identisch waren und es sicherlich zu Überlappungen zwischen den Tectumteilen kam.

2.3.5. Kann das Verhalten der Axone im Entscheidungsversuch durch chemische Modifikation verändert werden?

Um mehr über die chemische Natur der positionsspezifischen Komponenten von Membranpräparationen zu erfahren, wurden Membranschichten auf verschiedene Weise biochemisch behandelt (siehe auch Kapitel 3).

Neben Modifikationen, die nicht sichtbar werden (Fixierung, siehe 3.3.2.), können chemische Modifikationen von Membranschichten durch ein geändertes Wachstumsverhalten sichtbar werden (siehe unten: Lektine).

In den nachfolgenden Entscheidungsversuchen wurde jeweils die obere Membranschicht durch Vorinkubation mit Ricinus communis 60 Agglutinen (RCA60) modifiziert. Die durch RCA60 modifizierten Membranschichten sind im allgemeinen schlechtere Substrate als nicht behandelte Membranen. Deshalb war es vorzuziehen, als Substrat für das primäre Aus-

wachsen der Axone auf der unteren Membranschicht unbehandelte Membranen zu verwenden, während die behandelten Membranschichten auf der oberen Fläche angeboten wurden.

Temporale Axone zeigen keine Unterscheidung zwischen behandelten und normalen anterioren Membranen (Tabelle 5), bevorzugen aber behandelte anteriore vor posterioren Membranen zu 81 %. Posteriore modifizierte Membranschichten sind ein wesentlich schlechteres Substrat als posteriore Membranen.

Die Einzelresultate ergeben eine hierarchische Reihenfolge der bevorzugten Substrate: $A = A^* > P > P^*$. (* bedeutet modifiziert und > bedeutet besseres Substrat als). Der Vergleich von posterioren mit modifizierten posterioren Membranschichten führt zu der Schlußfolgerung, daß es auf dem posterioren Tectum Oberflächenkomponenten gibt, die temporalen Axonen das Wachstum ermöglichen. Werden diese Oberflächenkomponenten mit den Lektinmolekülen maskiert, so können die temporalen Axone nur noch äußerst schlecht auf dem modifizierten Substrat wachsen. Ob es sich um einen oder mehrere Typen von Oberflächenkomponenten handelt, die für das Wachstum erforderlich sind und durch das Lectin inaktiviert werden, ist noch unklar.

Das Wachstum von temporalen Axonen auf modifizierten anterioren Membranen ist nicht sichtbar verändert. Das könnte daran liegen, daß es im anterioren Tectum Komponenten gibt, die an der axonalen Erkennung beteiligt sind, von denen aber nur ein Teil durch Lektine maskierbar ist. Dann bleiben auf modifizierten anterioren Membranschichten noch

Oberflächenstrukturen erhalten, die für das Auswachsen retinaler Axone ausreichen, und deswegen wird ein Effekt der Lektinmodifikation nicht sichtbar.

Die Ergebnisse aus den Entscheidungsversuchen mit nasalen Axonen (Tab. 5) lassen keine eindeutige Erklärung bezüglich der Bevorzugung von Membranschichten zu. Anteriore Membranen werden nicht von modifizierten anterioren Membranvesikeln unterschieden. Anteriore modifizierte Membranen sind ein besseres Substrat als posteriore Membranen, und das steht im Widerspruch zu früheren Ergebnissen, in denen nasale Axone keinen Unterschied zwischen anterioren und posterioren Membranschichten (Tab.1) von 9-Tage-Embryonen machen. Eindeutige Ergebnisse zu diesem Versuchstyp lassen sich möglicherweise durch eine Verbesserung der Methode erzielen.

Unklarheit besteht ferner über das Ergebnis des Vergleiches zwischen posterioren modifizierten und posterioren Membranen. In drei Versuchen bevorzugen nasale Axone zu durchschnittlich 74% die modifizierten posterioren Membranen. Dieses Ergebnis würde bedeuten, daß posteriore Membranen nach einer Lektinmodifikation attraktiver für nasale Axone wären.

Entwicklungs-stadium	***obere*** Membranschicht / ***untere*** Membranschicht	Axone auf ***oberer*** Membranschicht / Axone auf ***unterer*** Membranschicht		Zahl der Versuche	***obere*** Membranschicht / ***untere*** Membranschicht	Axone auf ***oberer*** Membranschicht / Axone auf ***unterer*** Membranschicht		Zahl der Versuche
		nasale Retina	temporale Retina			nasale Retina	temporale Retina	
E5		*	*	2/2		≠	≠	2/2
E6		91/41 (69)	/	1/		49/117 (30)	7/230 (3)	1/1
E7	A/P	140/144 (49±15)	/	2/	P/A	280/350 (44±2)	32/175 (15±6)	2/2
E9		765/712 (52±12)	472/185 (72±12)	5/5		876/1270 (41±6)	10/936 (1±1)	7/6
E11		33/121 (21)	427/33 (93±2)	1/2		324/247 (57±6)	8/1700 (0)	4/8
P3		97/100 (50±1)	272/88 (76±1)	2/2		58/40 (59)	30/206 (13)	1/1

Tabelle 1: Entscheidungsversuche: Normal innervierte Tecta verschiedener Entwicklungsstufen.

Die Anzahl der Axone auf der oberen Membranschicht ist zu der Anzahl der Axone auf der unteren Membranschicht ins Verhältnis gesetzt. Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil der Axone wieder, die auf der oberen Membranschicht wachsen.
E = Embryonaltag, A = anteriores Tectum,
P = posteriores Tectum.

* Nach 5 Tagen langsamen Wachstums entscheidet sich der Großteil der Fasern, in Bündeln nach oben zu den anterioren Membranen zu wachsen.

≠ Von den wenigen auswachsenden Fasern entscheidet sich keine für posteriore Membranen.

/ Im Versuch sind zu wenige Fasern ausgewachsen.

Entwicklungs-stadium	*obere* Membranschicht / *untere* Membranschicht	Axone auf *oberer* Membranschicht / Axone auf *unterer* Membranschicht		Zahl der Versuche	*obere* Membranschicht / *untere* Membranschicht	Axone auf *oberer* Membranschicht / Axone auf *unterer* Membranschicht		Zahl der Versuche
		nasale Retina	temporale Retina			nasale Retina	temporale Retina	
E11 ni		$\frac{31}{24}$ (56)	$\frac{50}{0}$ (100)	1/1		/	/	
E12 ni	$\frac{A}{P}$	$\frac{72}{78}$ (48±10)	$\frac{267}{105}$ (72±4)	2/3	$\frac{P}{A}$	$\frac{75}{52}$ (59)	$\frac{12}{344}$ (3±2)	1/3
E14 ni		$\frac{333}{156}$ (68±5)	$\frac{490}{63}$ (89±4)	5/5		$\frac{419}{243}$ (63±10)	$\frac{68}{934}$ (7±3)	7/6

Tabelle 2: Entscheidungsversuche: Nicht innervierte Tecta. Nicht innervierte Tecta wurden durch Entfernen des contralateralen Auges an Tag E3 erhalten. Die Anzahl der Axone auf der oberen Membranschicht ist zu der Anzahl der Axone auf der unteren Membranschicht ins Verhältnis gesetzt. Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil der Axone wieder, die auf der oberen Membranschicht wachsen.

/ Im Versuch sind zu wenige Fasern ausgewachsen.

ni = nicht-innerviertes Tectum,
E = Embryonaltag, A = anteriores Tectum,
P = posteriores Tectum.

stadium	*untere* Membranschicht	Axone auf *unterer* Membranschicht nasale Retina	Axone auf *unterer* Membranschicht temporale Retina	Versuche	*untere* Membranschicht	Axone auf *unterer* Membranschicht nasale Retina	Axone auf *unterer* Membranschicht temporale Retina	Versuche
E9	A / A	386 / 404 (49±4)	366 / 440 (45±10)	3/3				
E9	A / A ni	63 / 91 (41)	301 / 280 52±3)	1/3	A ni / A	248 / 320 (44±5)	285 / 339 (46±10)	3/3
E6/9	A6 / A9	281 / 89 (76±13)	107 / 63 (63±14)	3/2				
E5/10	A5 / P10 ni	288 / 101 (74±8)	190 / 38 (83±7)	2/2	P10 ni / A5	36 / 272 (12±5)	14 / 300 (4±3)	3/3
E5/10	A5 / P10	223 / 60 (78±8)	52 / 19 (73)	2/1	P10 / A5	273 / 404 (40±17)	19 / 298 (6±1)	2/2

Tabelle 3: Entscheidungsversuche: Vergleich verschiedener Entwicklungsstufen.

Die Anzahl der Axone der oberen Membranschicht ist zu der Anzahl der Axone auf der unteren Membranschicht ins Verhältnis gesetzt. Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil der Axone wieder, die auf der oberen Membranschicht wachsen.

ni = nicht-innerviertes Tectum,

E = Embryonaltag, A = anteriores Tectum,
P = posteriores Tectum.

Entwicklungsstadium	*obere* Membranschicht / *untere* Membranschicht	Axone auf *oberer* Membranschicht / Axone auf *unterer* Membranschicht nasale Retina	Axone auf *oberer* Membranschicht / Axone auf *unterer* Membranschicht temporale Retina	Zahl der Versuche	*obere* Membranschicht / *untere* Membranschicht	Axone auf *oberer* Membranschicht / Axone auf *unterer* Membranschicht nasale Retina	Axone auf *oberer* Membranschicht / Axone auf *unterer* Membranschicht temporale Retina	Zahl der Versuche
E9	T1 / T3	340 / 420 (45±8)	359 / 118 (75±16)	5/3	T3 / T1	540 / 347 (61±12)	38 / 306 (11±6)	6/4
	T2 / T3	/	145 / 90 (62)	0/1	T3 / T2	547 / 372 (60±9)	102 / 445 (19±9)	3/3
	T3 / T4	465 / 338 (58±13)	290 / 51 (85±6)	3/3.	T4 / T3	432 / 250 (63±8)	118 / 511 (19±14)	4/4
	T4 / T5	351 / 287 (55±2)	157 / 76 (67±1)	5/3	T5 / T4	228 / 140 (62±1)	133 / 120 (53)	2/1

Tabelle 4: Entscheidungsversuche: Vergleich von Arealen verschiedener tectaler Position.

T1, T2, T3, T4, T5 entsprechen den fünf Teilen eines 9-Tage Tectums von anterior nach posterior.
Die Anzahl der Axone auf der oberen Membranschicht ist zu der Anzahl der Axone auf der unteren Membranschicht ins Verhältnis gesetzt. Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil der Axone wieder, die auf der oberen Membranschicht wachsen.

/ Im Versuch sind zu wenige Fasern ausgewachsen.
E = Embryonaltag.

Entwicklungsstadium	*obere* Membranschicht / *untere* Membranschicht	Axone auf *oberer* Membranschicht / Axone auf *unterer* Membranschicht		Zahl der Versuche
		nasale Retina	temporale Retina	
E9	$\frac{A^*}{A}$	$\frac{161}{153}$ (51±6)	$\frac{295}{349}$ (46±8)	2/2
	$\frac{P^*}{P}$	$\frac{193}{69}$ (74±11)	$\frac{11}{88}$ (11)	3/1
	$\frac{A^*}{P}$	$\frac{329}{145}$ (69±16)	$\frac{267}{62}$ (81±10)	3/3
	$\frac{P^*}{A}$	$\frac{109}{157}$ (41)	$\frac{4}{472}$ (0)	2/3

Tabelle 5: Entscheidungsversuche: Ricin-60 behandelte Membranschichten. Die Anzahl der Axone auf der oberen Membranschicht ist zu der Anzahl der Axone auf der unteren Membranschicht ins Verhältnis gesetzt. Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil der Axone wieder, die auf der oberen Membranschicht wachsen. E = Embryonaltag, A = anteriores Tectum, P = posteriores Tectum, * = Ricin 60-behandelte Membranschicht.

3. Wachstumsverhalten von retinalen Axonen auf verschiedenen Substraten

In Wachstumsversuchen wurde das Verhalten von retinalen Axonen auf Membranschichten aus verschiedenen Tectumarealen und auf chemisch modifizierten Membranschichten untersucht bezüglich ihrer Faserlängen und ihres Bündelungsverhaltens.

Die Versuche wurden nach ca. 40 Stunden Inkubation in einem inversen Phasenkontrastmikroskop ausgewertet. Die durchschnittliche Faserlänge wurde durch Ausmessen ermittelt, der Grad der Bündelung wurde subjektiv durch Vergleichen von Präparaten festgelegt.

3.1. Unterschiede im Wachstumsverhalten von nasalen und temporalen Axonen

Nasale und temporale Axone unterschieden sich stets deutlich in allen Versuchstypen. Alle Axone der nasalen Retina verhalten sich gleich, und entsprechend verhalten sich alle Axone der temporalen Retina gleich. Axone der temporalen Retina weisen im Gegensatz zu Axonen der nasalen Retina stets einen höheren Grad der Bündelung auf. Ein zunehmender Grad der Bündelung geht meistens einher mit einer Abnahme der Faserlänge, und dies kann gewertet werden als eine Reaktion der Axone auf ein sich verschlechterndes Substrat.

3.2. Wachstum auf Membranschichten aus verschiedenen Tectum- und Retinaarealen

Retinamembranen: Retinale Axone wachsen auf Membranen von nasaler und temporaler Retina vergleichbar gut aus und

erreichen eine Länge von ca. 800µm. Temporale Axone unterscheiden sich von nasalen in ihrer Faszikulierung, die auf nasalen retinalen Membranen als schwache und auf temporalen Membranen als starke Bündelung sichtbar wird (Tabelle 6).

Tectummembranen: Auf Membranen von posteriorem Tectum unterscheiden sich nasale von temporalen Axonen darin, daß temporale Fasern kürzer und stärker gebündelt auswachsen als nasale Axone. Dieses Verhalten ist auf Membranen von 9 Tage sowie 6 Tage alten Tecta zu bemerken, wiewohl die Axonlänge auf jungen Membranen kürzer ist (Tabelle 6).

Temporale Axone unterscheiden sich auf anterioren Membranschichten nur unwesentlich von nasalen Axonen.

Um das Verhalten der temporalen Axone auf Membranen von mittleren Tectumregionen zu untersuchen, wurden 9-Tage Tecta entlang der antero-posterioren Achse gefünftelt und den Axonen Membranschichten aus den jeweiligen Tectumfünfteln als Substrat angeboten (Tabelle 6). Dabei wird deutlich, daß sich die Wachstumsbedingungen für temporale Axone, gemessen an abnehmender Faserlänge (1200µm -> 400µm) und zunehmender Faszikulierung, von anterior nach posterior zunehmend verschlechtern. Auch im Verhalten der nasalen Fasern läßt sich ein ähnlicher, wenn auch weitaus geringerer Effekt bemerken.

Ein ähnlicher antero-posteriorer Effekt läßt sich durch Mischungsversuche erzielen. Anteriore Membranen wurden mit posterioren in bestimmten Verhältnissen versetzt, und je größer der Anteil an posterioren Membranen wird, desto schlechter werden die Membranschichten als Substrat. Eine Zusammenfassung dieser Experimente ist in Abb.4 schematisch dargestellt.

Zusammenfassend ergibt sich, daß je weiter posterior die Position der Herkunft der Membranen ist, desto kürzer und stärker gebündelt wachsen temporale Axone auf diesen Substraten.

3.3. Retinales Axonwachstum auf chemisch modifizierten Membranen

3.3.1. Modifizierung durch Lectine

Membranschichten (modifizierte Substrate sind mit * gekennzeichnet) retinalen und temporalen Ursprungs werden mit verschiedenen Lectinlösungen vorinkubiert: Ricinus communis 60 Agglutinin (RCA60), Peanut Agglutinin (PNA), Dolichos biflorus Agglutinin (DBA) und Soybean Agglutinin (SBA). Alle Lectine haben u.a. eine Bindungsspezifität für N-acetyl-galactosamin. Folgende Effekte wurden mit den verschiedenen Lektinen erzielt:

Retinamembranen: Auf lectinbehandelten retinalen Membranen wuchsen ca. 50% weniger Axone aus (Tabelle 7) als auf nichtbehandelten Membranen. Die Axonlänge war um ca. 1/3 auf 300-600µm reduziert. Nasale Axone bilden auf nasalen und temporalen Membranen dünne Faszikel, temporale Axone auf beiden Substraten kräftige Bündel.

Tectummembranen: Auf anterioren* 9-Tage-Membranen beträgt die Faserlänge von nasalen und temporalen Axonen ca. 1000um und ist somit gleich wie auf unbehandelten anterioren Membranen (Tabelle 6). Auf posterioren* Membranen wachsen temporale Axone nur noch halb so lang wie auf unbehandelten posterioren Membranen und sind stark gebündelt. Axone der nasalen Retina zeigen auf diesem Substrat ebenfalls einen höheren Grad an Bündelung.

Das Wachstumsverhalten nasaler und temporaler Axone auf behandelten Membranen von 6 Tage alten Tecta zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen auf nichtbehandelten Substraten.

Auf behandelten 14-Tage-Membranen wachsen nasale Axone sowohl auf anterioren* als auch auf posterioren* Membranen während der Standard-Inkubationszeit 600 bis 800 µm lang aus; die Faszikulierung ist auf posterioren* Membranen verstärkt. Temporale Axone zeigen wiederum, wie schon auf behandelten 9-Tage-Membranen, einen deutlichen Unterschied im Auswachsen auf anterioren* und posterioren* Membranen. Auf posterioren* Membranen ist die Faserlänge auf ca. 400µm reduziert (im Gegensatz zu ca. 1000µm auf anterioren* Membranen), und die Fasern weisen einen hohen Grad an Bündelung auf. Werden Membranschichten von nicht-innervierten 14-Tage-Tecta mit Lectinen modifiziert, so reduziert sich die Faserlänge aller auswachsenden Axone um ca. 1/3 im Vergleich zu Kontrollversuchen (Tabelle 7). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß Membranen relativ alter nicht-innervierter Tecta schlechtere Wachstumssubstrate sind als solche von normal innervierten Tecta.

Versuche mit RCA60-modifizierten Membranschichten aus Tectumfünfteln wurden entsprechend durchgeführt wie in 3.2. (Abb.4). Die Faserlänge temporaler Axone nimmt auf behandelten Substraten von anterior nach posterior stetig ab, von 1200µm auf T1 bis auf 0um auf T5. Mit abnehmender Faserlänge nimmt der Grad der Bündelung zu. Auf T4 wachsen temporale Fasern z.B. als sehr dicke, ca. 200-500µm lange Bündel. Nasale Axone wachsen im Durchschnitt ungefähr 1000µm, die

Faserlänge variiert jedoch in Einzelversuchen. Die Faszikulierung nasaler Axone ist geringfügig stärker auf relativ posterioren Membranen wie T4 und T5.

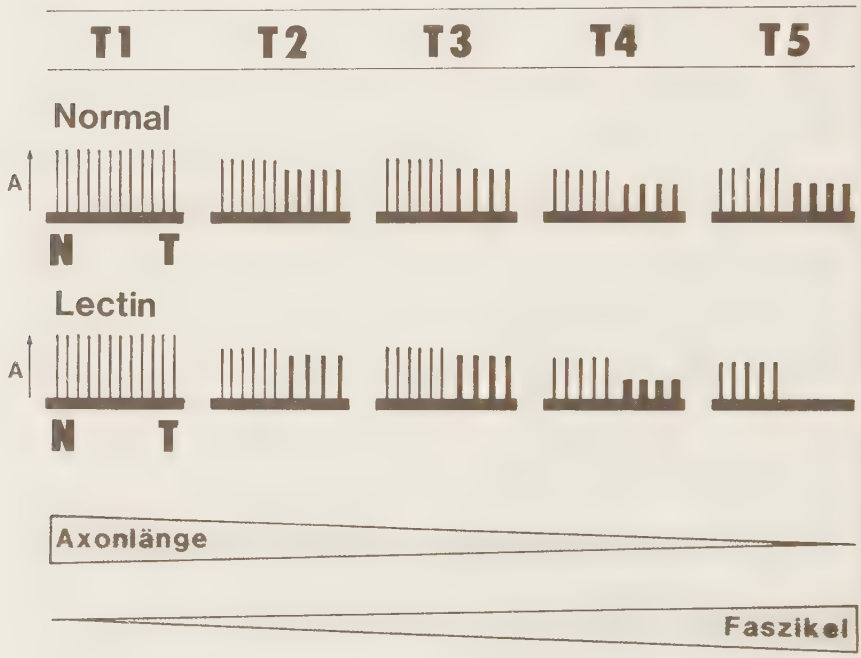


Abb. 4: Wachstumstest.
Aus einem 6-Tage-Retina-Explantat wachsen auf Membranschichten (normal bzw. lectinbehandelt) von 9-Tage-Tectumfünfteln (T1, T2, T3, T4, T5) Axone aus. Die Länge der Axone ist im angegebenen Fall A = 1200µm; die abgeschätzte Stärke der Bündelung der Axone ist in der Strichdicke wiedergegeben. (N = nasal, T = temporal, T1 = anterior, T5 = posterior).

In Abb.4 werden diese Versuche mit den Ergebnissen der Auswachsversuche auf nichtbehandelten Membranschichten (3.2.) verglichen. Dabei wird sowohl in den Kontroll- als auch in den RCA60-Versuchen deutlich, daß je weiter poste-

rior die Position der Herkunft der Membranen ist, desto stärker nimmt die Faserlänge der Axone ab und die Bündelung der Axone zu. In den RCA60-Versuchen nimmt die Faserlänge temporaler Axone schneller ab und geht auf 0 zurück.

In Membranmischungsversuchen wurden anteriore*, in steigendem Maße mit posterioren* Membranen versetzt (Tabelle 7). Auf Substraten mit hohem posteriorem* Anteil wachsen temporale Axone nur noch 200µm lang im Gegensatz zu 600-800µm auf stark anterior*-haltigen Membranschichten.

In den beschriebenen Versuchen wurde klar gezeigt, daß Zellmembranen durch Behandlung mit Lectinen insoweit modifiziert werden können, daß sie auswachsenden Axonen veränderte Substrateigenschaften entgegenbringen. Solche Veränderungen werden besonders deutlich im Wachstumsverhalten von temporalen Axonen. Im Vergleich von Membranen von nicht-behandelten und RCA60-modifizierten Tectumfünfteln (Abb.4) zeigen temporale Axone auf den jeweils modifizierten Substraten verringerte Faserlängen und stärkere Bündelung. Dieses Verhalten kann gedeutet werden als Reaktion der temporalen Axone auf mangelhafte Substrateigenschaften.

3.3.2. Modifizierung durch Fixierung

Anteriore und posteriore Membranen von 9-Tage alten Embryonen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und nach gründlichem Waschen als Substrate für Auswachsversuche verwendet. Nasale wie temporale Axone wuchsen wie in Kontrollversuchen und zeigten kein geändertes Verhalten (siehe auch 2.3.5.).

3.3.3. Modifizierung durch Antikörper

Anteriore und posteriore Membranschichten von 9-Tage alten Embryonen wurden mit anti-N-CAM vorinkubiert (Rutishauser et al., 1978a). Temporale Axone zeigen einen deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten auf anterioren und posterioren Membranen. Auf posterioren Membranen beträgt die Faserlänge ca. 500-600µm (im Gegensatz zu 1200µm auf anterioren Membranen), und die Axone sind stärker gebündelt als auf anterioren Membranen (Tabelle 8). Nasale Axone verhalten sich ähnlich auf beiden Substraten und zeigen mit einer Faserlänge von 1200um ein normales Wachstumsverhalten.

3.3.4. Modifizierung durch Proteasen

Anteriore und posteriore Membranschichten von 9-Tage Embryonen wurden mit Trypsin vorinkubiert mit dem Ergebnis, daß retinale Axone auf diesen modifizierten Substraten nicht mehr zu wachsen vermochten. Das Aussenden von Axonen durch die Ganglienzellen wurde nicht inhibiert. Viele Axone wuchsen an den Schnittkanten der Explantate entlang und erreichten beträchtliche Längen. Durch die Trypsinierung scheinen entscheidende Oberflächenkomponenten verlorengegangen zu sein, die für axonales Wachstum essentiell sind.

3.3.5. Modifizierung durch Glykosyl-Transferasen

Durch Inkubation der Membranschichten mit Galactosyltransferase und UDP-Galactose wurde versucht, zusätzliche Bindungsstellen auf den Membranen zu schaffen oder vorhandene zu beseitigen (Wallenfels, 1979). Nasale und temporale Axone zeigen jedoch weder auf anterioren noch auf posterioren modifizierten Membranen eine Änderung in ihrem Wachstumsverhalten im Vergleich zu Kontrollversuchen.

Gewebe	Behandlung	Faserlänge (µm) nasal	Faserlänge (µm) temporal	Bündelung nasal	Bündelung temporal	Zahl der Versuche
Nas. Retina E10	-	800	800	-	-	2
Temp.Retina E10	-	800	800	-	+	2
Ant. Tectum E9	-	1000-1200	1000-1200	-	±	8
Post.Tectum E9	-	1000	600- 800	-	+	8
Ant. Tectum E6	-	500- 600	600	-	±	2
Post.Tectum E6	-	600- 700	400	-	+	2
Tectum T1 E9		1200	1200	-	-	2
T2 E9		1000	800	-	±	2
T3 E9		1000	800	-	+	2
T4 E9		600-1000	500	±	++	4
T5 E9		500-800	400- 500	±	++	4
A:P = 2:1 E9		1000	1000	-	±	2
A:P = 1:1 E9		1000-1200	500-1000	-	±	2
A:P = 1:2 E9		800-1000	500-1000	+	+	2
A:P = 1:4 E9		500-1000	500- 800	±	+	2

Tabelle 6 Legende siehe Tabelle 8

Lectine

Gewebe	Behandlung	Faserlänge (µm) Nasal	Faserlänge (µm) Temporal	Bündelung Nasal	Bündelung Temporal	Zahl der Versuche
Nas. Retina E10	RCA, PNA	300- 400	300	±	+	3
Temp.Retina E10		300- 500	300- 600	±	+	3
Ant. Tect. E9	RCA,DBA,SBA,PNA	1000-1200	1000-1200	-	±	6
Post.Tect. E9		1000	400	+->±	+ (dünn)	6
Ant. Tect. E6	RCA,PNA,SBA	600- 800	600- 800	-	±	5
Post.Tect.E6		600- 800	600- 800	±	+	5
Ant. Tect.E14	PNA,RCA	800	800-1000	±	+	6
Post.Tect. E14		600- 800	400	+	++	6
Ant. Tect. E14ni	RCA,PNA	300- 500	500- 600	±	±	4
Post.Tect. E14ni		400- 600	300- 400	+	+	4
T1	RCA	1200	1200	-	-	2
T2		800-1000	500-1000	-	+	3
T3 E9		1000-1200	800-1000	-	+	2
T4		600-1000	200- 500	±	++	3
T5		300-1000	0	+		2
A:P = 2:1	RCA	900	600- 800	-	±	1
A:P = 1:1		1000	500- 800	±	+	1
A:P = 1:2 E9		600- 800	500	+	++	1
A:P = 1:4		500-1000	200	+	++	1

Antikörper

Gewebe	Behandlung	Faserlänge (µm) nasal	Faserlänge (µm) temporal	Bündelung nasal	Bündelung temporal	Zahl d. Versuche
Ant.Tect. E9	anti-N-CAM	1200	1200		±	2
Post.Tect.E9		1200-1000	500-600	- ->±	+	2

Tabelle 5: Wachstumstest: unter Zusatz von Antikörpern. Faserlänge (in µm) und Bündelung von nasalen und temporalen Axonen ist für das Wachstum auf anterioren und posterioren Tectmembranen angegeben. In allen Versuchen mit anti-N-CAM wurden die Membranen mit anti-N-CAM vorinkubiert.
Bündelung: - nicht gebündelt, ± dünne Bündel, + dicke Bündel , ++ sehr dicke Bündel).

Tabelle 6: Wachstumstest: Normaltectum. Faserlänge (in µm) und Bündelung von nasalen und temporalen Axonen ist für das Wachstum auf Membranschichten verschiedenen Ursprungs und Entwicklungsstufen angegeben. (T1, T2, T3, T4, T5, Testantteil entlang der antero-posterioren Achse; A:P = Mischungsverhältnisse von anterioren zu posterioren Membranen; Bündelung: - nicht gebündelt, + dünne Bündel, + dicke Bündel, ++ sehr dicke Bündel)

Tabelle 7: Wachstumstest: Lectinbehandelte Membranen. Faserlänge (in µm) und Bündelung von nasalen und temporalen Axonen ist für das Wachstum auf Lectinbehandelten Membranschichten verschiedener Ursprungs und verschiedener Entwicklungsstufen angegeben. (T1, T2, T3, T4, T5, Testanteil entlang der antero-posterioren Achse; A:P = Mischungsverhältnisse von anterioren zu posterioren Membranen; Bündelung: - nicht gebündelt, ± dünne Bündel, + dicke Bündel, ++ sehr dicke Bündel;
n.i. = nicht innerviertes Tectum, RCA = Ricinus communis 60 Agglutinin; PNA = Peanut Agglutinin; DBA = Dolichos biflorus Agglutinin; SBA = Soybean Agglutinin).

IV. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß retinale Axone *in vitro* auf Schichten aus Zellmembranen wachsen können, und zwar mit ähnlichen Wachstumsgeschwindigkeiten und Maximallängen wie auf Zellmonolayern *in vitro* (Bonhoeffer und Huf, 1982). Weiterhin wurde belegt, daß Zellmembranen je nach dem Ursprungsgewebe, aus dem sie gewonnen werden, positionsspezifische Oberflächenkomponenten exprimieren, die von auswachsenden Axonen erkannt und unterschieden werden können.

Da bisher nur gezeigt war, daß retinale Axone Unterschiede zwischen retinalen und tectalen Zellen und ferner zwischen Zellen verschiedener Position im Tectum als verschieden (Bonhoeffer und Huf, 1982) erkennen, war es durchaus denkbar, daß Erkennungsprozesse zwischen Axon und Zielzelle auf einer aktiven Wechselwirkung beruhen, bei der der Stoffwechsel der Zielzelle eine bedeutende Rolle spielt. Dieser Einwand konnte durch die vorliegenden Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden. Der wesentliche Prozeß der Erkennung von positionsspezifischen Zelloberflächenkomponenten durch das Axon läuft unabhängig vom Zellmetabolismus der Zielzelle ab und beruht auf einer Erkennung von Komponenten der Zellmembran durch Axone. Die Verwendung von Membranpräparationen ist eine Eingrenzung der möglicherweise an der axonalen Zielfindung beteiligten Faktoren.

Die verwendeten Membranpräparationen sind nicht völlig rein, sondern nur angereichert an Zellmembranen. Sie enthalten geringe Mengen an Mitochondrien, wenig endoplasmatisches Reticulum, aber keine Kerne und *keine* ganzen Zellen

(Halfter, 1983). Sie enthalten vermutlich einen bedeutenden Anteil an Inside-Out-Vesikeln (Evans, 1978).

Untersuchungen an Membranen aus embryonalem Hühnerhirn (Hendrickson und Lin, 1984), die mit einer vergleichbaren Prozedur isoliert wurden, ergaben, daß die Aktivität von Membranrezeptoren (in diesem Fall Opiatrezeptoren) vollständig erhalten geblieben war. Angesichts diesen Resultats darf erwartet werden, daß in den Tectummembranen die meisten Oberflächenkomponenten erhalten bleiben, obwohl möglicherweise eine teilweise oder totale Degradation von bestimmten Komponenten nicht ausgeschlossen werden kann. Auf die Zugabe von Proteaseinhibitoren in das Kulturmedium wurde verzichtet, um die Wachstumskegel der Axone, die selbst spezifische Proteasen sezernieren (Pittman, 1984) nicht in ihrem Wachstum zu beeinflussen.

Die Retinaexplantate wurden stets von 6-Tage Embryonen entnommen, weil zu diesem Entwicklungszeitpunkt das Auswachsen von Axonen *in vitro* ein Optimum erreicht (Halfter, 1983). Dieses Optimum ist korreliert mit dem Auftreten postmitotischer Ganglienzellen *in vivo*, das während einer Periode zwischen E3 und E7 exponentiell zunimmt (Kahn, 1973). Bei der Herstellung der Retinaexplantate wird die Retina in Streifen gehackt. Das bedeutet, daß Axone, die bereits in der Retina ausgewachsen waren (Goldberg und Coulombre, 1972; Krayanek und Goldberg, 1981) von ihren Ganglienzellen abgeschnitten werden.

Somit stellt sich zum einen die Frage, ob die *in vitro* auswachsenden Axone regenerierende Axone sind oder *de novo* auswachsen. Axone des Zentralnervensystems regenerieren fast

ausschließlich nur in niederen Vertebraten, wie Fisch und Frosch (Reviewartikel Dahlem-Konferenzen, 1982). Es gibt Evidenzen für Regeneration im optischen Nerv der Ratte, die jedoch noch nicht vollständig abgesichert sind. Untersuchungen an retinalen Axonen des Huhns in vivo konnten nicht eindeutig klären, ob Axone der embryonalen Retina regenerieren können (Goldberg, 1981). Mit der Annahme, daß die aus den Retinaexplantaten auswachsenden Axone de novo gebildet werden, wird nicht berücksichtigt, daß die in vitro-Kulturbedingungen regenerierenden Axonen möglicherweise bessere Voraussetzungen liefern. Die Zahl an auswachsenden Axonen aus einem Retinaexplantat auf Zellmembranschichten oder Zellmonolayern (Bonhoeffer und Huf, 1982) ist stark reduziert im Vergleich zu der Zahl von Axonen, die auf der Basalmembran der Retina in vitro auswachsen (Henke-Fahle et al., 1984). Das mag daran liegen, daß durchtrennte Axone im Explantat nicht mehr regenerieren, sondern degenerieren, und dieser Verlust durch de novo-Synthese nicht ausgeglichen werden kann. Eine Möglichkeit, das massive Auswachsen von Axonen auf Basalmembranen zu erklären, ist die Annahme, daß Basalmembranen Komponenten enthalten, die ein hervorragendes Substrat für axonales Wachstum und möglicherweise auch für axonale Regeneration sind, in Zellmembranen jedoch nicht oder nur reduziert vorkommen. Der begünstigende Einfluß von bestimmten Substraten auf die Regeneration von Axonen des Zentralnervensystems wurde für die Ratte beschrieben (Benfey u. Aguayo, 1982).

Die Tatsache, daß auf Zellmembranen weniger Axone aus einem Explantat auswachsen als eigentlich möglich, führt zum

andern zu der Frage nach der Selektion. Beobachten wir nur eine Auswahl von Axonen mit bestimmten Eigenschaften, eine Selektion von Fasern, die in vitro neu synthetisiert wurde? Obwohl diese Frage im Augenblick ungeklärt bleibt, ist d eindeutig gezeigt, daß die beobachteten temporalen Axone sehr spezifische Eigenschaften haben und positionsspezifische Komponenten auf Tectummembranen erkennen.

In einem Entscheidungssystem wurden auswachsenden Axonen gleichzeitig zwei Membranschichten verschiedener Herkunft (Zelltyp, Zellposition, Alter) als Substrate angeboten. Folgende Schlußfolgerungen können aus den Ergebnissen gezogen werden.

(1) Temporale Axone unterscheiden sich von nasalen Axonen in ihrer Entscheidungsfähigkeit.

(2) Temporale Axone bevorzugen Membranen aus anteriorem Tectum unabhängig vom Entwicklungsstand des Tectums und unabhängig von einer vorausgegangenen Innervation des Tectums.

(3) Positionsspezifische Membrankomponenten sind gradiert vom anterioren zum posterioren Pol über das Tectum verteilt und werden von temporalen Axonen erkannt.

(4) Membrankomponenten können mit Lektinen modifiziert werden, so daß sich die Substrateigenschaften der Membranen spezifisch verändern.

(5) Nasale Axone zeigen nur in einigen wenigen Versuchen (anteriores junges Tectum, siehe 2.3.2) eine Präferenz für Membranschichten aus bestimmten tectalen Arealen.

Zu 1):

Ein Unterschied zwischen Axonen der nasalen und der temporalen Retina konnte schon in anderen Systemen gezeigt werden (Halfter, 1981; Bonhoeffer und Huf, 1982). In jenen Untersuchungen wie auch in dieser Arbeit verläuft scheinbar eine Grenze entlang der naso-temporalen Mittellinie der Retina; alle nasalen Axone sowie alle temporalen Axone verhalten sich untereinander gleich. Um eine retinotope Projektion der Retina auf das Tectum zu erhalten, würde man gradiert verteilte Unterschiede in der Retina fordern, wie sie entlang der dorso-ventralen Retinaachse mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern entdeckt worden sind (Trisler et al., 1981). Es bleibt deshalb unklar, ob die beobachteten Unterschiede zwischen nasalen und temporalen Axonen, die keine Gradienten erkennen lassen, irgend etwas mit dem Entstehungsmechanismus der retinotopen Projektion zu tun haben.

Zu 2):

Temporale Axone zeigen im Vergleich von anterioren und posterioren Membranen stets eine eindeutige Präferenz für anteriore Membranen, unabhängig vom Entwicklungstag des Tectums zwischen Embryonaltag E5 und Postnataltag P3. Das bedeutet, daß anteriores Tectum in den untersuchten Stadien immer verschieden ist vom posterioren Tectum. Der Entwicklungsvorsprung des anterioren gegenüber dem posterioren Tectum in jungen Embryonen, der sich zum Tag E16 *in vivo* ziemlich ausgeglichen hat (LaVail, Cowan, 1971), kann somit nicht allein für die Entscheidung temporaler Axone verantwortlich sein.

Um ausschließen zu können, daß Membranen einander entsprechender Reifestadien, aber unterschiedlicher Position im Tectum, ähnliche Eigenschaften haben, wurden Membranen aus jungem anteriorem mit älterem posteriorem Tectum verglichen (2.3.2). Dieser Vergleich resultiert wiederum in einer Bevorzugung des anterioren Tectums durch temporale Axone. Hieraus ist folgender Schluß zu ziehen: temporale Axone erkennen positionsspezifische Komponenten auf Membranvesikeln des anterioren Tectums und bevorzugen anteriore Membranen verschiedener Reifestadien gegenüber Membranpräparationen gleicher Reife, aber posteriorer Position. Ob anteriore Membranen verschiedener Entwicklungstage unterschiedlich sind, wurde nicht intensiv untersucht. Zwei Versuche, in denen anteriore Membranen von Tag E6 mit solchen von Tag E9 verglichen wurden, deuten darauf hin, daß junge anteriore Membranen attraktiver sind als ältere (Tabelle 3, Reihe 3). Ein ähnlicher Effekt, der für eine besondere Attraktivität jungen anterioren Tectums spricht, wird in einem späteren Absatz für nasale Axone diskutiert werden.

Untersuchungen mit Membranschichten aus Tieren, die jünger als Embryonaltag E5 waren, wurden nicht ausgeführt, weil bereits Membranschichten aus 5-Tage-Tecta sehr schlechte Substrate für axonales Wachstum waren. Wenige Axone wuchsen auf den Membranschichten der jungen Tecta aus und benötigten für eine Länge, die Axone auf anterioren Membranen älterer Tecta in zwei Tagen erreichten, bis zu 5 Tage. Trotzdem enthalten auch anteriore Membranen junger Tecta positionsspezifische Komponenten, die von temporalen Axonen erkannt und posterioren Membranen vorgezogen werden.

Durch die fortschreitende Innervation des Tectums, die zum Entwicklungstag E6 am anterioren Pol beginnt und bis Tag E14 das ganze Tectum mit Axonen bedeckt (Goldberg, 1974), enthalten Membranpräparationen älterer Tecta höhere Anteile an Membranvesikeln aus Axonmaterial. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß in vitro auswachsende Axone sich bevorzugt an Vesikeln aus Axonmaterial orientieren, wurden den Embryonen in frühen Entwicklungsstadien ein Auge entfernt. Die contralateralen jungfräulichen Tecta erhalten noch Afferenzen vom ipsilateralen Auge (McLoon und Lund, 1982; Thanos und Bonhoeffer, 1984b; Ehrlich und Mark, 1984). Die ipsilaterale retinotectale Projektion ist zeitlich begrenzt auf die Enwicklungstage E6 bis E16 und verschwindet dann vollkommen; die Anzahl der Axone (2000-4000 Axone) ist so gering gegenüber der Anzahl der contralateral innervierenden Axone (ca. 4 Millionen Tag E9, Thanos und Bonhoeffer, 1984c), daß die ipsilaterale Projektion in diesen Untersuchungen vernachlässigt wurde.

Ein zusätzliches Ergebnis ist, daß ein Tectum nicht erst durch die Innervation von retinalen Axonen Signale erhält, um sich in eine gewisse Richtung zu differenzieren. Wie schon von anderen Autoren gezeigt (Barbera, 1975; O Leary und Cowan, 1983), entwickelt sich ein Tectum auch in Abwesenheit retinaler Innervation normal.

In zwei unterschiedlichen Testsystemen (Entscheidungstest, Wachstumstest) konnte indirekt eine gradierte Verteilung von positionsspezifischen Komponenten festge-

stellt werden. Komponenten, die entlang der antero-posterioren tectalen Achse von anterior nach posterior gradiert verteilt sind, werden von temporalen Axonen erkannt. Im Entscheidungstest bevorzugen temporale Axone jeweils die relativ anteriore Membranschicht gegenüber der relativ posterioren.

Im Wachstumstest vermögen temporale Axone auf relativ anterioren Membranen besser (länger, nur schwach gebündelt) zu wachsen als auf relativ posterioren Membranen (kurz, dicke Faszikel). Angenommen, es handelt sich bei den beiden beobachteten Gradienten um Verteilungen der gleichen positionsspezifischen Komponenten, so bedeutet das, daß temporale Axone diese anterioren Komponenten sowohl anderen Komponenten vorziehen als auch zum Wachstum brauchen. Es ist zu bemerken, daß in diesen in vitro-Versuchen temporale Axone auf Substraten aus tectalen Arealen auswachsen, die sie in vivo nie kontaktieren (Crossland et al., 1974) oder z.T. nur vorübergehend innervieren würden (McLoon, 1982). Überlegungen zu der Einordnung der empirisch gefundenen Gradienten in die Vorstellungen über das Zustandekommen der retinotopen Projektion auf das Tectum folgen in einem späteren Absatz.

Zu 4):

Übereinstimmend zeigen Entscheidungs- und Wachstumsversuche, daß die mit Lectinen (Ricin 60) (Trojanowski, 1983) modifizierten posterioren Membranen relativ schlechte Substrate sind. Beim Vergleich des Wachstumsverhaltens von temporalen Axonen auf modifizierten und normalen Membranen von Tectumarealen (Abb.4) sind die modifizierten Membranen stets ein schlechteres Substrat als die nomalen.

Möglicherweise werden mit den Lektinen Komponenten auf den Membranen maskiert, die gleichmäßig auf dem gesamten Tectum vorkommen und unspezifisch axonales Wachstum fördern. Nach Inkubation dieser Komponenten mit Lectinen bliebe dann nur die gradierte positionsspezifische Komponente erhalten, die im posterioren Tectum nur in geringem Maße vorkommt (Abb.3; Tabelle 7, Absatz 2).

Außer mit Ricin 60 ließen sich in Wachstumsversuchen vergleichbare Effekte mit anderen Lectinen (Peanut Agglutinin; Dolichos biflorus Agglutinin, Soybean Agglutinin; Lis und Sharon, 1973) erzielen, die eine ähnliche Spezifität für dieselben Zucker haben, die von Ricin 60 erkannt werden. Alle verwendeten Lectine zeigen eine hohe Spezifität für N-acetylgalactosamin (Hammarström et al., 1977)und zum Teil zusätzlich für Galactose. Die Spezifität von Lectinen für ihre Bindungsstellen (Zucker, Zuckersequenzen) ist weitgehend geklärt. Aber nur wenig ist darüber bekannt, ob Lectine ihre Bindungsstellen immer oder nur in bestimmten Positionen und Konfigurationen im Glykoanteil von Glykoproteinen und -lipiden erkennen. Das ist bedingt durch fehlende Information über die Zusammensetzung von Glykokonjugaten in verschiedenen Spezies und Geweben, die man sich gerade erst durch den Einsatz von spezifischen Lectinen zu bekommen erhofft.

Obwohl Lectine spezifisch an bestimmte Zucker binden, ist die Auswahl an Zuckern, aus denen Glykoanteile zusammengesetzt sind, im wesentlichen auf sieben Moleküle beschränkt (Lactose, Fucose, Glucose, Mannose, Galactose, N-acetylgalactosamin, N-acetylglucosamin). Das bedeutet, daß häufig

alle Zucker in den Zuckerketten eines Glykokonjugates enthalten sind. Somit ist es schwierig, bestimmte Glykokonjugate selektiv mit Lectinen zu markieren. Trotz dieser Problematik sind Unterschiede in der Zusammensetzung von Zelloberflächen mit fluoreszierenden Lectinen nachgewiesen worden (z.B. Denburg et al., 1983, Gualandris et al., 1983).

Interessant ist die Korrelation zwischen den Ergebnissen der Ricin 60-Versuche und denen der anti-N-CAM-Versuche (Rutishauser et al., 1978a). Nach Inkubation posteriorer Membranen mit anti-N-CAM verhielten sich temporale Axone ähnlich wie in den Ricin 60-Versuchen, wenn auch die Effekte nicht ganz so drastisch ausfielen. Durchaus denkbar ist, daß Ricin 60 an ähnliche Determinanten des neuronalen Zelladhäsionsmolekül (N-CAM) bindet (Edelman, 1983),wie anti-N-CAM.

Bislang ist bekannt, daß anti-N-CAM die Adhäsion zwischen Nervenzellen und Neuriten in vitro herabsetzt (Rutishauser et al., 1978a, Rutishauser et al., 1978b) und das Wachstumsverhalten von Axonen entlang anderer Axone nach Injektion ins Auge in vivo (Thanos et al., 1984c) stört.

Zu 5):

Nasale Axone wurden bis jetzt aus der Diskussion ausgeklammert, weil sie keine Präferenzen für Membranen aus tectalen Arealen entwickelten und somit nicht dem entsprachen, was man sich erhofft hatte. Nasale Axone projizieren in vivo auf das posteriore Tectum (Crossland et al., 1974). Wären alle Oberflächenkomponenten des posterioren Tectums während der Membranpräparation nativ erhalten geblieben, so wäre zu

hoffen gewesen, daß nasale Axone posteriore Membranschichten solchen aus anteriorem Tectum vorgezogen hätten. Diese Hoffnung erfüllte sich nicht, denn in fast allen (bis auf 2 Versuchstypen, siehe unten) Versuchen entschieden sich nasale Axone nicht präferentiell für anteriore oder posteriore Membranen, sondern teilten sich in annähernd gleichen Verhältnissen zwischen den Membranschichten auf (Tabelle 1). Es sind verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für die fehlende Präferenz nasaler Axone denkbar. Zum einen könnten in vivo diffusible, von den lebenden tectalen Zielzellen sezernierte Substanzen eine Rolle spielen. Doch auch in Versuchen mit Zellmonolayern (Bonhoeffer und Huf, 1982) zeigten nasale Axone keine Präferenz für posteriore Tectumzellen. Zum andern besteht die Möglichkeit, daß positionsspezifische Moleküle der posterioren Tectummembranen während der Inkubation degradiert werden. Auch dieser Erklärungsversuch ist letztlich nur unbefriedigend. Vielleicht darf man sich an dieser Stelle auf die Ausrede berufen, daß nicht zu erwarten ist, daß in vitro-Versuche in allen Details die in vivo-Situation widerspiegeln.

Nasale Axone entwickelten eine Präferenz für Membranen aus anteriorem Tectum, wenn die Tecta sehr jung waren (E5, E6). Anteriore Membranen (E5, E6) wurden sowohl posterioren Membranen desselben Entwicklungstages (Tabelle 1) als auch eines fortgeschrittenen Reifestadiums (E10) vorgezogen (Tabelle 3). Für anteriore Membranen aus Tecta, die älter waren als Tag E6, verschwand diese Präferenz vollkommen. Die Attraktivität jungen anterioren Tectums mag bedingt sein durch Komponenten, die für alle Axone (auch temporale) interessant

sind und die, aus welchen Gründen auch immer, nur regional-spezifisch und temporär auf diese Tectumregion beschränkt sind. Die Tatsache, daß der anteriore Teil des jungen Tectums einen Entwicklungsvorsprung gegenüber dem posterioren Teil aufweist (LaVail, Cowan, 1971), reicht nicht aus, die Attraktivität jungen anterioren Tectums gegenüber älterem (E10) posteriorem Tectum zu erklären, da sich die Reifezustände der betreffenden Tectumareale entsprechen.

Eine noch unbewiesene Denkmöglichkeit ist, anzunehmen, daß die Komponenten, die das anteriore Tectum so attraktiv machen, das Anfangsstadium eines Gradienten darstellen und sich nach Tag 6 gradiert über das ganze Tectum verteilen. Es ist äußerst schwierig, solche Hypothesen im Versuch zu beweisen, weil gerade im jungen Tectum mehrere Entwicklungsprozesse gleichzeitig ablaufen, die schwer voneinander zu trennen sind: Die Reifung des Tectums von anterior nach posterior, die Reifung der Schichten in der Dickendimension (LaVail, Cowan, 1971) und im besonderen die Reifung der Neuronen der Corticalplatte, ausgehend von der tectalen Zentralregion zur Peripherie (Rager, 1980).

In vitro- und in vivo-Versuche zur retino-tectalen Spezifität

Die Spezifität der retino-tectalen Verknüpfungen ist ein Phänomen, das in verschiedenen Versuchsansätzen von mehreren Autoren untersucht wurde. Das Versuchskriterium früherer in vitro-Versuche war ausschließlich Adhäsion von Zellen oder Zellmembranen an Zellen retinaler und tectaler Herkunft (Barbera et al., 1973; Gottlieb et al., 1974,

Gottlieb et al., 1976; Gottlieb und Arington, 1979). Zellen aus dorsaler Retina banden bevorzugt an ventrale Tectumhälften und ventrale Retinazellen bevorzugt an dorsale Tectumhälften (Barbera et al., 1973). Diese Ergebnisse decken sich mit der in vivo-Repräsentation der Retina auf dem Tectum. In dieser Arbeit zeigten Axone der dorsalen bzw. ventralen Retina keine signifikante Vorliebe für ventrale bzw. dorsale Tectummembranen. Aus zwei Gründen stellt das erarbeitete System einen methodischen Fortschritt gegenüber den Versuchen von Barbera dar. Zum einen treffen retinale Axone und nicht deren Perikarya die Entscheidung zwischen zwei verschiedenen Substraten, was der in vivo-Situation sehr nahekommt. Retinale Axone unterscheiden sich nämlich in ihren Oberflächenzusammensetzungen von ihren Zellkörpern, was mit fluoreszierenden Lectinen deutlich gemacht werden konnte (Kleinschuster und Moscona, 1972; Bee, 1982; Bonhoeffer und Huf, 1980). Zum andern werden nur die Axone von retinalen Ganglienzellen beobachtet und nicht eine Mischung von retinalen Zellen aller Schichten.

Ob Axone retinaler Explantate auch in situ im sich entwickelnden Tier ihre Zielareale auf dem Tectum erkennen, wurde in Transplantationsversuchen untersucht (Goldberg, 1974; DeLong und Coulombre, 1967; Thanos, 1983). Retinale Explantate aus definierten Retinaarealen wurden direkt auf die Tectumoberfläche unter die Pia mater transplantiert (Thanos, 1983). Axone aus nasalen Explantaten, die ins anteriore Tectum transplantiert worden waren, wuchsen wie erwartet in Richtung des posterioren Tectums aus. Wird das gleiche Explantat in posteriores Tectum transplantiert, so

wachsen die Axone nicht in posteriorer Richtung weiter. Axone aus temporaler Retina verhielten sich entgegengesetzt zu nasalen Axonen. Ins posteriore Tectum transplantiert, wuchsen sie in Richtung des anterioren Tectumpols und somit entgegengesetzt zur Entwicklungsrichtung des optischen Tectums. Axone aus dorsaler und ventraler Retina zeigten keine Richtungspräferenz für ventrales oder dorsales Tectum. Diese Versuche zeigen in Übereinstimmung mit den in vitro-Versuchen dieser Arbeit, daß retinale Axone entsprechend ihrem Ursprung in der Retina positionsspezifische Unterschiede entlang der antero-posterioren Achse des Tectums erkennen. Die Versuche geben uns keine Anhaltspunkte dafür, daß retinale Axone Unterschiede entlang der dorso-ventralen Tectumachse erkennen.

Für die Benutzung von in vitro-Systemen spricht, daß man die Mechanismen von Teilprozessen der axonalen Zielfindung untersuchen kann, die in der komplexen in vivo-Situation nicht erkennbar werden. Die experimentelle Einschränkung auf retinales Axon und tectale Zellmembran erlaubt die Aussage, daß die Wechselwirkung zwischen Axon und Zellmembran für eine spezifische Erkennung ausreicht. Dagegen kann aus diesen Untersuchungen nicht geschlossen werden, daß die positionsspezifische Erkennung der Oberflächenkomponenten von Zellmembranen die einzig mögliche Erklärung für die Entstehung der retinotopen Projektion auf dem Tectum ist. Möglicherweise tragen andere Mechanismen in vivo dazu bei, den Prozeß zu optimieren. Eine Vorordnung der retinalen Axone in Raum und Zeit im optischen Trakt (Review: Walsh und Guillery, 1984) mag das Auffinden des entsprechenden Ziel-

areals erleichtern.Hingegen ist aus Regenerationsexperimenten im Frosch, in denen nachweisbar die alte Faserordnung nicht wieder hergestellt war, bekannt, daß eine retinotop organisierte Projektion auch ohne korrekte Vorsortierung möglich ist (Fujisawa, 1981; Fujisawa et al., 1982). Ebenso können Nerven von ektopisch implantierten Augen im Molch auf abnormalen Wegen ein Tectum spezifisch und retinotop innervieren (Harris, 1982).

Vorstellungen zur axonalen Zielfindung

Verschiedene Vorschläge wurden gemacht, um die Zielfindung von Axonen zu erklären: Axonales Wachstum in Kanälen (Singer et al., 1979; Silver, 1984) oder entlang Pionierfasern (Bate, 1976), Zeit als Ordnungsprinzip (Rager, 1976), Faser-Faser-Wechselwirkung (Willshaw und von der Malsburg (1976), die spezifische Erkennung von Zelloberflächenmolekülen (Sperry, 1963; Fraser, 1980; Gierer, 1981). Nachfolgend sollen nur diejenigen erwähnt werden, die eigenständig und ohne wesentliche Zusatzhypothesen die Bildung der retinotectalen Projektion erklären können.

Die Einhaltung von Nachbarschaftsbeziehungen der Axone untereinander (Willshaw und von der Malsburg, 1976) gemäß der Vorstellung von Faser-Faser-Wechselwirkungen ermöglicht die topographische Abbildung der Retina auf das Tectum. Jedoch die Bildung von topographischen Projektionen, die trotz einer nachweisbar gestörten Ordnung erreicht wird, kann nur erklärt werden unter Zuhilfenahme von anderen Prinzipien, wie dem der spezifischen Erkennung von Oberflächenmarkierungen. Es gibt zwei verschiedene Denkmöglichkeiten,

sich die Bildung einer topographischen Projektion durch die Erkennung von Oberflächenmolekülen vorzustellen:

1. Trüge jedes Axon ein positionsspezifisches Oberflächenmolekül, durch das es eine besondere Affinität für eine positionsspezifische Komponente seiner tectalen Zielzelle hätte, so könnte auf diese Weise eine retinotope Abbildung auf das Tectum erzielt werden. Dieser Verknüpfungsmechanismus (Chemoaffinitätstheorie, Sperry 1963) wird aber unpraktikabel, wenn man sich die große Zahl der zu verknüpfenden Neurone vorstellt und damit die notwendigerweise große Zahl an verschiedenen Molekülen beachtet, die erforderlich ist, um eine präzise Abbildung mit hohem Auflösungsvermögen zu erhalten. Außerdem könnten nach diesen Vorstellungen Axone ihre Zielgebiete nur über erratisches Suchen finden. Jedoch die Tatsache, daß Axone sehr gerichtet auf ihre Terminationsgebiete zuwachsen, legt nahe, daß sie während ihres Wachstums richtungsgebende Faktoren ihrer Umgebung wahrnehmen.

2. Wenige verschiedene Determinanten wären ausreichend, wenn sie gradiert über Retina und Tectum verteilt sind (Gradientenmodelle: Fraser, 1980; Gierer, 1981). In diesen Gradientensystemen erhielte jede Retinazelle und ihr Axon eine positionsspezifische Markierung. Jedes Axon bewegte sich auf dem Tectum, ausgerichtet durch die Wirkung der tectalen Gradienten auf diese positionsspezifische Markierung zu seiner Zielregion. Theoretisch reichen in diesen Modellen, um die Projektion in einer Dimension (z.B. anterior-posterior) zu beschreiben, ein gradiert verteiltes Molekül in der Retina und zwei antagonistische Gradienten

auf dem Tectum aus. Für die andere Dimension (dorso-ventral) würde ein entsprechender Satz an Gradienten benötigt (Review Bonhoeffer und Gierer, 1984).

Verfolgt man den Weg eines Axons vom Zeitpunkt des Verlassens der Retina bis zur Synapsenbildung in spezifischen tectalen Arealen, so wird die Beteiligung verschiedener Mechanismen an der Zielfindung und Zielerkennung sehr wahrscheinlich. Die Reihe der Mechanismen würde möglicherweise beginnen mit einer Vorsortierung von Axonen (dorso-ventral) im optischen Nerv und Trakt durch Interaktion der Fasern untereinander oder mit den unterliegenden Substraten. Die in einer Dimension vorsortierten Axone fänden ihre Zielzellen im tectalen Gradientensystem entsprechend ihrer Ursprungsposition im retinalen Gradientensystem. Eine Verfeinerung der Projektion würde erreicht durch elektrische Aktivität und Kompetition von Axonen in benachbarten Zielarealen (Reh und Constantin-Paton, 1984).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß tectale Zellmembranen positionsspezifische Oberflächenkomponenten tragen, die gradiert vom anterioren zum posterioren Tectumpol verteilt sind und von temporalen retinalen Axonen erkannt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Axone, die von Explantaten der Hühnerretina in vitro auswachsen, wurden bezüglich ihres Wachstumsverhaltens auf Schichten von Zellmembranen verschiedener Herkunft untersucht. Es wurde gezeigt, daß Zellmembranen von Tectum- und Retinagewebe ein gutes Wachstumssubstrat sind. Bündelungsverhalten und Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Längenwachstum wurden bestimmt. Stärke der Bündelung sowohl von nasalen wie auch von temporalen Axonen auf tectalen Membranen ist abhängig von dem Ursprung der tectalen Membranen. Je weiter posterior die Position des Tectumsgewebes, aus dem die Membranen isoliert werden, desto stärker ist die Bündelung und desto kürzer sind die ausgewachsenen Axone. Dieser Positionseffekt ist viel ausgeprägter für temporale als für nasale Axone. Nach Inkubation der Membranschichten mit Lectinen (z.B. Ricin 60) verschlechtern sich die Substrateigenschaften von posterioren Membranen insbesondere für temporale Axone.

In Versuchen, die so angelegt sind, daß axonale Wachstumskegel gleichzeitig Kontakt zu zwei Flächen haben, die mit zwei verschiedenen Zellmembranpräparationen beschichtet sind, wurde untersucht, ob die Wachstumskegel präferentiell auf bestimmten Zellmembranen wachsen. Temporale Axone bevorzugen Membranen aus anteriorem gegenüber solchen aus posteriorem Tectum entsprechend ihrer Projektion in vivo. Diese Präferenz tritt unabhängig vom Entwicklungsstadium und unabhängig von einer vorausgegangenen Innervation des Tectums auf. Temporale Axone erkennen eine positionsspezifische Komponente des Tectums, die gradiert verteilt ist: je mehr anterior die Position des Tectumsgewebes, von dem die Zellmembranen isoliert werden, desto attraktiver ist die Membranschicht für temporale axonale Wachstumskegel. Nasale Axone bevorzugen Membranen aus sehr jungem anteriorem Tectum gegenüber solchen aus älterem anteriorem und aus posteriorem Tectum.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Barbera, A.J.: Adhesive recognition between developing retinal cells and the optic tecta of the chick embryo. Dev. Biol. 86, 101-111 (1981).

Barbera, A.J., Marchase, R.B., and Roth, S.: Adhesive recognition and retinotectal specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. 70 No.9, 2482-2486 (1973).

Bate, C.M.: Pioneer neurons in an insect embryo. Nature 260, 54-55 (1976).

Bee, J.A.: A cytochemical study of lectin receptors on isolated chick neural retina neurons in vitro. J. Cell Sci. 53, 1-20 (1982).

Benfey, M. and Aguayo, A.J.: Extensive elongation of axons from rat brain into periphral nerve grafts. Nature 296, [illegible].

Bonhoeffer, F. and Gierer, A.: How do retinal axons find their targets on the tectum? TINS 7 No.10, 378-381 (1984).

Bonhoeffer, F. and Huf, J.: Recognition of cell types by axonal growth cones in vitro. Nature 288 (No.5787) 162-164 (1980).

Bonhoeffer, F. and Huf, J.: In vitro experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posteror gradient on the tectum. EMBO J. 1, 427 (1982).

Brunette, D.M. and Till, J.E.: A rapid method for the isolation of L-cell surface membranes using an aqueous two-phase polymer system. J.Membr.Biol. 5, 215-224 (1971).

Buser, P. and Dussardier, M.: Organisation des projections de la retine sur le lobe optique, étudiée chez quelques Téleosteens. Rev. trim. microg. 3, 15-65 (1953).

Cajal, S.Ramon y: Estructura del lobulo optico de las aves y origin de los nervios pticos. Rev. trimestr. Histol. 3 4 (1889)

Claviez, M.: Kultur embryonaler Hühnchen-Retina: Eigenschaften auswachsender Neuriten und ihre Wechselwirkung mit der Umgebung. Dissertation, Tübingen 1980.

Crossland, W.J., Cowan, W.M., Rogers, L.A. and Kelly, J.P.: The specification of the retino-tectal projection in the chick. J.Comp.Neur. 155, 127-164 (1974).

Dahlem-Konferenzen, Berlin 1982: Repair and Regeneration (Ed.: Nicolls, J.G.), Springer 1982

DeLong, G.R. and Coulombre, A.J.: The specificity of retinotopic connections studied by retinal grafts into the tectum in chick embryos. Dev. Biol. 16, 513-531 (1967). D

Denburg, J.L., Eastburn, J.L. and Caldwell, R.T.: Lectin receptors in the cockroach neuromuscular system. I. Distribution among the set of coxal depressor muscles. Brain Res. 289, 241-252 (1983).

Edelman, G.M.: Cell adhesion molecules. Science 219, 450-457 (1983).

Ehrlich, D. and Mark, R.: An Atlas of the primary visual projections in the brain of the chick Gallus gallus. J.Comp. Neur. 223, 592-610 (1984).

Evans, W.H.: Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. North-Holland, 1978.

Fraser, S.E.: A differential adhesion approach to the patterning of nerve connections. Dev. Biol. 79, 463-464 (1980).

Fujisawa, H.: Retinotopic analysis of fiber pathways in the regenerating retinotectal system of the adult newt CYNOPS. Brain Res. 206, 27-37 (1981).

Fujisawa, H., Tani, N., Watanabe, K. and Ibata, Y.: Branching of regenrating retinal axons and preferential selection of appropriate branches for specific neuronal connections in the newt. Dev. Biol. 90, 43-57 (1982).

Gaze, R.M., Keating, M.J. and Chung, S.H.: The evolution of the retinotectal map during development in Xenopus. Proc. Roy. Soc. Lond. B 185, 301-330 (1974).

Gierer, A.: Development of projections between areas of the nervous system. Biol. Cybern. 42, 69-78 (1981).

Goldberg, S.: Studies on the mechanics of development of the visual pathways in the chick embryo. Dev. Biol. 36, 24 (1974).

Goldberg, S. and Coulombre, A.J.: Topographical development of the ganglion cell fiber lyer in the chick retina. A whole mount study. J. Comp. Neur. 146, 507-518 (1972).

Goldberg, S. and Frank, B.: Do young axons regenerate better than old axons? Exp. Neurol. 74, 245-262 (1981).

Gottlieb, D.I. and Arington, C.: Patterns of adhesive specificity in the developing central nervous system of the chick. Dev. Biol. 71, 260-273 (1979).

Gottlieb, D.I., Merrell, R. and Glaser, L.: Temporal changes in embryonal cell surface recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 No.5., 1800-1802 (1974).

Gottlieb, D.I., Rock, K. and Glaser, L.: A gradient of adhesive specificity in developing avian retina. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73 No.2, 410-414 (1976).

Gualandris, L., Rougé, P., Duprat, A.M.: Membrane changes in neural target cells studied with fluorescent lectin probes. J. Embryol. exp. Morph. 77, 183-200 (1983).

Halfter, W.: Explantate der embryonalen Vogelretina als in vitro Modell axonaler Orientirung im entstehenden Zentralnervensystem von Vertebraten. Dissertation Tübingen 1983.

Halfter, W., Claviez, M. and Schwarz, U.: Preferential adhesion of tectal membranes to anterior embryonic chick retina neurites. Nature 292, 67 (1981).

Hammarström, S., Murphy, L.A., Goldstein, I.J. and Etzler, M.E.: Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-"specific" lectins: Helix pomatia A hemagglutinin, soy bean agglutinin, lima bean lectin, and Dolichos biflorus lectin. Biochem. 16 No.12 (1977).

Hamburger, V. and Hamilton, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J.Morph. 88, 49-92 (1951).

Harris, W.A.: The transplantation of eyes to genetically eyeless salamanders: visual projections and somatosensory interactions. J.Neurosci. 2 (No.3), 339-353 (1982).

Hendrickson, C.M. and Lin, S.: Isolation of surface membranes from neuronal and non-neuronal cell populations from embryonic chick brain. Opiate receptor activity of neuronal membranes. Neurosci. Lett. 46, 109-114 (1984).

Henke-Fahle, S., Reckhaus, W. and Babiel R.: Influence of various glycoprotein antibodies on axonal outgrowth from the chick retina. In: Physiological and pharmacological control of nervous system development (F. Caciagli, ed.) Elsevier, 1984.

Kahn, A.J.: Ganglion cell formation in the chick neural retina. Brain Res. 63, 285-290 (1973).

Kern-Veits, B.: Auswachsen von retinalen Axonen in vitro. Regionalspezifisches Erkennen von Zellmembranen durch retinale Axone in vitro. Diplomarbeit Universität Hohenheim 1981.

Kern-Veits, B. and Bonhoeffer, F.: Recognition of cell position-specific properties on cell membranes by axonal growth cones in vitro. Neuroscience Letters 10, 267 (1982).

Kleinschuster, S.J. and Moscona, A.A.: Interactions of embryonic and fetal neural retina cells with carbohydrate-binding phytoagglutinins: cell surface changes with differentiation. Exp. Cell Res. 70 397-410 (1972).

Krayanek, S. and Goldberg, S.: Oriented extracellular channels and axonal guidance in the embryonic chick retina. Dev. Biol. 84, 41-50 (1981).

LaVail, J.H. and Cowan, W.M.: The development of the chick optic tectum. I Normal morophology and cytoarchitectonic development. Brain Res. 28, 391 (1971).

Lis, H. and Sharon, N.: The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins) Ann. Rev. Bioch. 42 541 (1973).

McLoon, S.C.: Alterations in precision of the crossed retinotectal projection during chick development. Science 215, 1418-1420 (1982).

McLoon, S.C. and Lund, R.D.: Transient retinofugal pathways in the developing chick. Exp. Brain Res. 45, 277-284 (1982).

O´Leary, D.D.M. and Cowan, W.M.: Topographic organization of certain tectal afferent and efferent connections can develop normally in the absence of retinal input. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 6131-6135 (1983).

Pittman, R.N.: Neuron-target cell interaction may involve protease-inhibitor interactions. Soc. Neur. Abstr. 194.5 Vol. 10 (1984).

Rager, G.: Morphogenesis and physiogenesis of the retinotectal connection in the chicken. II The retinotectal synapse. Proc. R.Soc. London Ser B 192, 353-370 (1976)

Rager, G.: Die Ontogenese der retinotopen Projektion - Beobachtung und Reflexion. Naturwissenschaften 67, 280-287 (1980).

Reh, T.A. and Constantin-Paton, M.: Retinal ganglion cell terminals change their projection site during larval development of rana pipiens. J. Neurosci. 4 No.2, 442-457 (1984).

Rutishauser, U., Gall, W.E. and Edelman, G.M.: Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia. J. Cell Biol. 79, 382-353 (1978a).

Rutishauser, U., Thiery, J.-P., Brackenbury, R., Edelman, G.M.: Adhesion among neural cells of the chick embryo. III. Relationship of the surface molecule CAM to cell adhesion and the development of histotypic patterns. J. Cell Biol. 79, 371-381 (1978b).

Scholes, J.H.: Nerve fiber topography in the retinal projection to the tectum. Nature 278, 620-624 (1979).

Singer, M., Nordlander, R.H. and Egar, M.: Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: the blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning. J. Comp. Neur. 185, 1-22 (1979).

Silver, J.: Studies on the factors that govern directionality of axonal growth in the embryonic optic nerve and at the chiasm of mice. J.Comp.Neur. 223, 238-251 (1984).

Silver, J. and Sidman, R.D.: A mechanism for the guidance and topographic patterning of retinal ganglion cell axons. J. Comp. Neurol. 189, 101-111 (1980).

Sperry, R.W.: Optic nerve regeneration with return of vision in anurans. J. Neurophys. 7, 57-70 (1944).

Sperry, R.W.: Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fibre patterns and connections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 703-710 (1963).

Straznicky, K. and Gaze, R.M.: Growth of the retina in Xenopus laevis: An autoradiographic study. J. Embryol. exp. Morphol. 26, 67-79 (1971).

Straznicky, K. and Gaze, R.M.: The development of the tectum in Xenopus leavis: An autoradiographic study. J. Embryol. exp. Morphol. 28, 87-115 (1972).

Stuermer, C.A.O.: An evaluation of the hypothesis of shifting terminals in goldfish optic tectum. J.Neurosci. 4 (No.4) 1052-1063 (1984).

Thanos, S.: Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen der Enwicklung und des Verlaues retinotectaler Nervenfasern im Hühnerembryo. Dissertation, Tübingen 1983.

Thanos, S. and Bonhoeffer, F.: Development of the transient ipsilateral retinotectal projection in the chick embryo: A numerical fluorescence microscopic analysis. J. Comp. Neur. 224, 407-414 (1984b).

Thanos, S., Bonhoeffer, F. and Rutishauser, U.: Fiber-fiber interaction and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 1906-1910 (1984c).

Thanos, S., Fujisawa, H. and Bonhoeffer, F.: Elimination of ipsilateral retinotectal projections in mono-ophthalmic chick embryos. Neurosci. Lett. 44, 143-148 (1984a).

Thiery, J.P., Brackenbury, R., Rutishauser, U. and Edelman, G.M.: Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. J.Biol.Chem. 252, 6841-6845 (1977).

Trisler, G.D., Schneider M.D. and Nierenberg, M.: A topographic gradient of molecules in retina can be used to identify neuron position. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 No.4, 2145-2149 (1981).

Trojanowsky, J.Q.: Native and derivatized lectins for in vitro studis of neuronal connectivity and neuronal cell biology. J. Neurosci. Methods 9, 185-204 (1983).

Wallenfels, B.: Development and mutational changes of glycoproteins in the mouse neuronal retina: Studies with bovine galactosyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76/7, 3223-3227 (1979).

Walsh, C. and Guillery, R.W.: Fibre order in the pathways from the eye to the brain. TINS, June 208-211 (1984).

Willshaw, D.J. and von der Malsburg, C.: How patterned neural connections can be set up by self organization. Proc. R. Soc. London Ser B 194, 431-445 (1976).

D A N K

Diese Arbeit entstand unter Anleitung von Dr. Friedrich Bonhoeffer am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen. Dr. Friedrich Bonhoeffer danke ich herzlich für seine Unterstützung und konstruktive Kritik während der Durchführung dieser Arbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt Julita Huf für die Einführung in die Explantat-Technik und für viele wertvolle Tips. All meinen Kolleginnen und Kollegen, ganz besonders Dr. Sigrid Henke-Fahle und Dr. Claudia Stürmer, danke ich für Ratschläge, Diskussionen und Hilfestellungen. Dank an Klara Ralinofsky für die Reinschrift des Manuskripts und nicht zuletzt Dank der ganzen Gruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Am 23. August 1955 wurde ich als Tochter von Richard und Elisabeth Kern in Nürtingen geboren. Nach 4 Jahren Grundschule von 1962 - 1966 besuchte ich das Max-Planck-Gymnasium in Nürtingen, an dem ich 1974 das Abitur ablegte. Ich studierte 2 Semester an der Pädagogischen Hochschule Esslingen mit dem Fachschwerpunkt Biologie/Mathematik. Ab dem Wintersemester 1975/76 studierte ich an der Universität Stuttgart-Hohenheim Biologie und schloß das Studium mit den Diplomprüfungen im Juni 1980 ab. Von Juli 1980 bis Juni 1981 fertigte ich am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie eine Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. F. Bonhoeffer an. Seit Juli 1981 arbeite ich am selben Institut an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Bayreuther
F. Bonhoeffer
E.E. Bruchmann
A. Gierer
H. Hahn
D. Hess
W. Kraus
F. Lingens
F. Mechelke
P. Pfänder
H. Rahmann
H. Rentschler
H. Rösner

Lebenslauf

Am 23. August 1955 wurde ich als Tochter von Richard und Elisabeth Kern in Nürtingen geboren. Nach 4 Jahren Grundschule von 1962 - 1966 besuchte ich das Max-Planck-Gymnasium in Nürtingen, an dem ich 1974 das Abitur ablegte. Ich studierte 2 Semester an der Pädagogischen Hochschule Esslingen mit dem Fachschwerpunkt Biologie/Mathematik. Ab dem Wintersemester 1975/76 studierte ich an der Universität Stuttgart-Hohenheim Biologie und schloß das Studium mit den Diplomprüfungen im Juni 1980 ab. Von Juli 1980 bis Juni 1981 fertigte ich am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie eine Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. F. Bonhoeffer an. Seit Juli 1981 arbeite ich am selben Institut an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Bayreuther
F. Bonhoeffer
E.E. Bruchmann
A. Gierer
H. Hahn
D. Hess
W. Kraus
F. Lingens
F. Mechelke
P. Pfänder
H. Rahmann
H. Rentschler
H. Rösner